Über den Einfluß photodynamisch wirksamer Farbstofflösungen auf pflanzliche Zellen und Gewebe

von

Josef Gicklhorn,

Assistenten des Pflanzenphysiologischen Institutes der k. k. Universität in Wien.

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien.

Nr. 65 der II. Folge.

(Mit 1 Doppeltafel.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 19. März 1914.)

I. Einleitung, Charakteristik der photodynamischen Erscheinung, Plan der Arbeit.

Unter den physiologischen Arbeiten der letzten Jahre treten experimentelle Untersuchungen zur Klärung lichtbiologischer Fragen stark in den Vordergrund. Obwohl dabei oft lange bekannte Erscheinungen durch eine neue Fragestellung einer Klärung zugeführt werden sollen, sind doch auch Lichtwirkungen in letzter Zeit bekannt geworden, die viel Neues und Eigenartiges bieten. Nur zwei seien beispielsweise angeführt: die für den Photochemiker interessanten Farbenänderungen der Fulgide bei Belichtung und Verdunklung, die als »Phototropie« bezeichnet wurde. Ferner eine biologische Lichtwirkung, deren Kenntnis durch v. Tappeiner und seine Mitarbeiter, dann durch Hausmann, durch Arbeiten aus dem Finsen-Institut etc. wesentlich gefördert wurde und die von v. Tappeiner »vorläufig, bis zur Klärung ihrer Beziehung zu Fluoreszenz und Sensibilisation als photodynamische« bezeichnet wurde (Tappeiner, I, 703).

Diese Lichtwirkung äußert sich darin, daß Lösungen fluoreszierender Farbstoffe noch in einer enormen Verdünnung

bei Sauerstoffgegenwart unter Lichtzutritt und Abhaltung der Wärmestrahlen auf Organismen oder Zellen, die in der Lösung sich befinden, schädigend oder tötlich einwirken.

Bei gleicher Versuchsanstellung im Dunkeln erfolgt innerhalb der entsprechenden Zeit entweder gar keine merkbare Beeinflussung durch die Lösung oder eine Schädigung der Versuchsobjekte setzt viel später ein und ist dann einer Giftwirkung im allgemeinsten Sinne des Wortes zuzuschreiben. Ausführliche Studien haben den sicheren Nachweis erbracht, daß die photodynamische Wirkung einer Farbstofflösung mit der Fähigkeit der Fluoreszenz aufs engste verknüpft ist.

Dabei braucht eine Fluoreszenz nach außen hin gar nicht bemerkbar zu sein, aber bei Verwendung von Licht verschiedener Farbe und damit verschiedener Brechbarkeit, Wellenlänge und Absorptionsfähigkeit in einer Lösung, wird eine Wirkung nur dann zu beobachten sein, wenn jene Strahlen geboten werden, die fluoreszenzerregend sind. Es ist die photodynamische Wirkung sogar ein einfaches Mittel, die Fluoreszenz einer Lösung zu eruieren, an der dieses optische Phänomen nicht ohne weiteres zu erkennen ist oder nur im Strahlenkegel eines Brennglases auftritt.

Es kann aber durch eine geeignete Versuchsanstellung die für einen Erklärungsversuch der Erscheinung prinzipiell wichtige Tatsache leicht demonstriert werden, daß nicht das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht, sondern die durch Absorption in der Lösung zurückgehaltene Lichtenergie für eine Schädigung der Versuchsobjekte maßgebend ist. Die Wirkung ist zweifellos in den ersten Phasen eine chemische, auffällige Strukturänderungen sind das Sekundäre. Denn es gelingt auch, durch das System Licht + fluoreszierende Farbstofflösung Enzyme, Toxine, Präzipitine etc. zu inaktivieren. Ebenso konnte der Reaktionsverlauf chemisch wohl definierter Verbindungen beeinflußt werden und da für das Zustandekommen und den Verlauf photochemischer Prozesse — um solche handelt es sich hier — das Grundgesetz der Photochemie anzuwenden ist, daß nur absorbierte Lichtenergie eine Zustandsänderung auslöst, so war der im wesentlichen chemische Charakter der Schädigung erwiesen. In Übereinstimmung mit Untersuchungen,

wo nur ausgestrahltes und daher unwirksames Licht die Versuchsobjekte treffen konnte, weisen auch diese rein chemischen Untersuchungen auf eine Grundbedingung für das Auftreten der photodynamischen Wirkung hin. Von den bekanntesten, als Paradigma hingestellten photochemischen Umsetzungen lichtempfindlicher Systeme ist die photodynamische Wirkung dadurch verschieden, daß sie auch durch Strahlen der roten Spektralhälfte hervorgerufen werden kann und daß für sie freier O erforderlich ist. Große Ähnlichkeit weist unsere Lichtwirkung aber mit der von Vogel (1873) entdeckten Sensibilisation photographischer Platten auf, die nach Zusatz gewisser Farbstoffe eine gesteigerte Lichtempfindlichkeit erlangen und bei denen der wirksame Strahlenbezirk nach Rot hin erweitert werden kann. Der Gedanke, daß vielleicht der photodynamischen Wirkung eine ähnliche Erweiterung oder Steigerung der Empfindlichkeit für gewöhnliches sichtbares Licht und Beschleunigung seiner Wirkung auf lebende Zellen, Gewebe oder Organismen bei O-Gegenwart zugrunde liegt, ist auch schon in der ersten Publikation (O. Raab und v. Tappeiner) ausgesprochen. Ganz ungeklärt ist die Beziehung einer solchen Sensibilisation zur Fluoreszenz, denn bei der Sensibilisation photographischer Platten ist einerseits freier O nicht notwendig und überdies sind auch gewisse nichtfluoreszierende Lösungen für den Effekt als geeignet befunden worden.

Von der Wirkung des ultravioletten Lichtes sowohl auf Organismen als auch auf chemisches Geschehen in der Eprouvette ist die photodynamische Wirkung in mancher Beziehung verschieden.

Ohne den Anspruch, durch die eben dargelegte Auffassung der photodynamischen Erscheinung als Sensibilisation das Wesen dieser Lichtwirkung erkannt zu haben, brachten zahlreiche Untersuchungen von Physiologen und Chemikern weiterhin mehr oder minder bedeutsame Resultate zu den verschiedensten Fragen über Dunkelwirkung der Lösungen allein, den Einfluß der Vorbelichtung der Objekte oder der Lösungen, dem Orte des Angriffes einer Schädigung, die Beziehungen zu Konzentration, Temperatur, Reaktion etc. Diesen Arbeiten reihen sich experimentell-therapeutische und klinische Studien

praktischer Mediziner an, die eine Verwertung der photodynamischen Wirkung in der Lichttherapie anstrebten.

Was bis zum Jahre 1909 an einschlägiger Literatur vorlag, hat v. Tappeiner in einem außerordentlich übersichtlichen Sammelreferat (1) mit größter Vollständigkeit zusammengetragen.

Indem ich auf dieses Referat verweise, glaube ich, in meiner Arbeit von einer neuerlichen ausführlichen Zusammenstellung und knappen Inhaltsangabe bereits dort berücksichtigter Untersuchungen wohl absehen zu können, um so mehr, als zur nötigen Orientierung für den Leser die wesentlichsten Ergebnisse dieser Studien so kurz, als es anging, bereits oben dargelegt sind. Bezüglich des letzten Abschnittes vorliegender Arbeit, der zeigen soll, inwieweit die Ergebnisse von Experimentaluntersuchungen über Bedingungen für das Zustandekommen der photodynamischen Wirkung und die Anschauungen, die man sich über das Wesen dieser eigenartigen Lichtwirkung gebildet hat, zur Klärung der noch immer offenen Frage über die Rolle des Chlorophylls bei der CO_2-Assimilation verwertbar sind, kann ich mich betreffs Literaturzitate ebenfalls auf zwei ausführliche Zusammenstellungen berufen. Ich meine einerseits einen gelegentlich des Internationalen botanischen Kongresses zu Wien 1905 von Molisch gehaltenen Vortrag (18), der bei einer ungemein klaren und dabei knappen Behandlung des außerordentlich umfangreichen Gebietes doch weit mehr bietet als »eine Übersicht über den heutigen Stand dieses Problems«. Unter Hinweis auf eigene kritische Untersuchungen bei Anwendung von zwei der feinsten Methoden der Mikrochemie, beziehungsweise Biologie, der Bakterienmethode von Engelmann und der von Beiyerinck und Molisch ausgearbeiteten Leuchtbakterienmethode, können nach diesem Vortrag die Angaben über eine angebliche CO_2-Assimilation von Chlorophyllösungen außerhalb der lebenden Zelle — Abspaltung von freiem Sauerstoff als Kriterium einer stattfindenden CO_2-Spaltung bei Lichtzutritt betrachtet — als endgültig widerlegt gelten. In diesem Vortrag spricht sich ferner Molisch zugunsten der »Sensibilisationshypothese« aus, die heute unter Hinweis auf die Ergebnisse der Studien über die photodynamische Wirkung die wünschenswerte, auf Experimente gestützte Basis erhalten hat.

Die zweite umfassende Behandlung aller die Fragen der CO_2-Assimilation betreffenden Angaben gibt Czapek in seiner neu erschienenen Biochemie (13, II, 4. Kapitel), der seinen meist referierenden Ausführungen ein sehr vollständiges Literaturverzeichnis zugrunde legt. Einzelne Arbeiten, die mit den in vorliegender Arbeit diskutierten Fragen oder Resultaten in engerem Zusammenhang stehen, werden in den betreffenden Abschnitten eingehender berücksichtigt und sind dann auch ausführlich zitiert.

Das oben erwähnte Referat von v. Tappeiner gab die Anregung zur Durchführung vorliegender Arbeit. Bei einer Durchsicht dieser Zusammenstellung mußte es auffallen, daß bis heute keine Untersuchungen über die photodynamische

Wirkung auf pflanzliche Zellen und Gewebe vorliegen, mit Ausnahme solcher Arbeiten, die den Einfluß auf Bakterien, Hefezellen und Schimmelpilze studierten. Die dabei erhaltenen Resultate lassen nicht ohne weiteres Schlüsse auf das Verhalten höherer Pflanzen oder pflanzlicher Zellen mit anderen physiologischen Eigenschaften zu und eine Durchführung von Versuchen auf breiter Basis unter Verwendung der verschiedensten pflanzlichen Zellen und Geweben schien daher wünschenswert.

Dabei mußte sich ergeben, inwiefern hier die photodynamische Wirkung von der verwendeten Lösung, der Dauer der Einwirkung etc. abhängig ist. Weiter konnte die Frage geprüft werden, wie die einzelnen für die verwendeten Versuchsobjekte charakteristischen Lebensäußerungen, z. B. Assimilation und Plasmaströmung, zu beeinflussen sind.

Das verschiedene Verhalten von chlorophyllfreien und chlorophyllhaltigen Zellen, respektive Geweben oder Organismen, wie es bei Studien über andere Lichtwirkungen auf pflanzliche Gewebe wiederholt aufgefallen war, mußte auch bei der photodynamischen Erscheinung berücksichtigt werden. Wenn die Versuchsobjekte, z. B. Wasserpflanzen, in die Lösungen ohne besondere Vorsichtsmaßregeln übertragen werden, so kommt gleichzeitig eine große Reihe anhaftender Organismen, Algenschwärmer, Infusorien, Amöben und Dauerzustände tierischer und pflanzlicher Organismen mit in die Lösung; es war also darauf zu achten, ob zeitliche und individuelle Verschiedenheiten dabei zu bemerken sind und wie bei längerer Versuchsdauer die erst in der Lösung eventuell sich entwickelnden Formen sich verhalten werden. Und endlich konnten systematisch durchgeführte Untersuchungen vielleicht eine Erklärung geben für eine Reihe von Literaturangaben, wo auf Grund irgendeiner Fragestellung Farbstofflösungen verwendet wurden und wo ohne ausdrücklichen Hinweis auf die photodynamische Wirkung, die dabei auftreten konnte, das verschiedene Verhalten von Dunkel-, beziehungsweise Lichtversuchen beobachtet wurde.

Es drängt mich, bereits an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. H. Molisch, für die Zuweisung des Themas

und für das Interesse, das er meiner Arbeit immer entgegenbrachte, meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. O. Richter für die stete Förderung meiner Untersuchungen. Ferner möchte ich hier nochmals der hohen Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien danken, die mir zur Durchführung dieser Versuche eine Subvention aus dem Legate Scholz übermittelt hat.

II. Eigene Untersuchungen.

A. Methodik.

Nach diesen Ausführungen soll gleich anschließend das Wichtigste über Methodik und Versuchsbedingungen, Versuchsobjekte und Kriterien einer aufgetretenen Wirkung zusammengestellt sein.

Bei Verwendung von makroskopisch großen Versuchsobjekten, z. B. *Elodea*-Sprossen, *Ceratophyllum*, *Hydrodictyon* etc., kamen diese in kleine Batteriegläser, »Küvetten« (10 × 7·5 × 4 *cm* mit hellen, planparallelen Wänden in immer gleich große Mengen der fluoreszierenden Farbstofflösung (250 cm^3). Um bei länger andauernden Versuchen ein zu starkes Verdunsten und damit ein Konzentrierterwerden der Lösung zu vermeiden, wurden die Küvetten mit entsprechend großen Platten von Milchglas oder auch von starkem schwarzen Karton bedeckt, ebenso Stücke von schwarzem Karton von der Größe der Schmalseiten an diese angedrückt, so daß bei einer längeren Reihe von Küvetten das Licht möglichst von der Breitseite her die Objekte gleichmäßig treffen konnte. An die von der Lichtrichtung abgewendeten Breitseiten der Küvetten war ein langer Streifen des käuflichen, rein weißen Kartons bis knapp an die Glaswand gerückt, um auch noch das reflektierte Licht auszunützen und eine große Helligkeit in den Lösungen zu erzeugen.

Die Küvetten mit den Versuchsobjekten standen in einem Holzkasten, der durch ein horizontal eingefügtes Brett in zwei ungleich große Abteilungen geteilt war; in ein oberes, hohes Fach, um die Aufstellung von zwei Küvettenreihen auch übereinander zu ermöglichen und in eine untere, niedrigere Abteilung, die zur Aufnahme der Dunkel- und der Kontrollversuche in reinem Wasser bestimmt war. Hier konnten die Küvetten selbstverständlich beliebig hintereinander gestellt werden, während die dem Licht exponierten in längeren Kolonnen nebeneinander zu stehen kamen. Beide Abteilungen waren durch die eingefalzten, leicht verschiebbaren Bretterwände der Breitseite des Holzkastens leicht zu erreichen und konnten lichtdicht abgeschlossen werden. Das untere Fach, wo die Dunkelversuche aufgestellt waren, blieb während der Versuchsdauer immer geschlossen und erst wenn in den belichteten Küvetten eine Schädigung der Versuchsobjekte eingesetzt hatte oder diese ziemlich weit vorgeschritten war, wurden auch die Dunkelversuche kontrolliert. Eine gleich-

zeitige Schädigung in den Licht- und Dunkelversuchen wurde niemals beobachtet, auch bei Verwendung sehr hoher Farbstoffkonzentrationen war im Licht die Schädigung doch merklich früher.

An jener Seite des oberen Faches, wo das Licht einfallen konnte, wurde die verschiebbare Bretterwand entfernt und dafür eine geschlossene Reihe von hohen und schmalen Küvetten ($27 \times 18 \times 3$ *cm*) aufgestellt, die mit Leitungswasser gefüllt waren und als Filter für die dunklen Wärmestrahlen wirkten. Diese Vorsichtsmaßregel, das Abhalten der Wärmestrahlen, ist unbedingt erforderlich bei Verwendung von direktem Sonnenlicht oder während der Versuchsanstellung im Hochsommer, denn die Temperaturdifferenz zwischen dunkelgestellten und belichteten Lösungen kann durch Absorption des eingestrahlten Lichtes in den letzteren bis zu 10° C. und noch mehr betragen. Beachtet man aber jene Vorsichtsmaßregel, so betragen die Temperaturdifferenzen bei nicht zu langer Versuchsdauer nur 1 bis 2° C.

Durch die eben dargelegte Versuchsanordnung sollte einerseits erreicht werden, Versuche und Kontrolle unter möglichst gleichen äußeren Bedingungen zu haben, andrerseits sollten die Versuchsobjekte der Dunkel- und Lichtversuche für eine mikroskopische Kontrolle — orientierende mikroskopische Untersuchungen wurden immer in nächster Nähe der Versuche vorgenommen — rasch zur Hand sein, um den zeitlichen Verlauf der photodynamischen Wirkung feststellen zu können.

Handelte es sich aber darum, die photodynamische Wirkung fluoreszierender Farbstofflösungen dauernd mikroskopisch zu verfolgen, so wurde einerseits bei kleinen Objekten die übliche mikroskopische Präparation angewendet, andrerseits die Untersuchung freibeweglicher Objekte (Paramäcien, Stentor, Hydra etc.) in einer flachen Uhrschale vorgenommen. Oft wurde die Schale unbedeckt bei abgeblendetem Spiegel und gesenktem Kondensor auf den Mikroskoptisch gestellt und das Mikroskop dem Licht exponiert. Für eine Kontrolle wurden die Objekte dann für kurze Zeit im durchfallenden Lichte beobachtet (bei schwacher Vergrößerung).

Für die Versuche über die Wirkung auf die Plasmaströmung wurde die übliche Präparation angewendet. Mit der Pinzette wurden Blätter von *Elodea* abgerissen und in einer Uhrschale in Leitungswasser so lange belassen, bis im ganzen Blatt eine lebhafte Strömung eingetreten.

Dann wurde eine größere Zahl solcher Blätter in die Farbstofflösung übertragen, dem Licht exponiert, wobei eine mikroskopische Kontrolle nach je $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde vorgenommen wurde. Entweder wurden die Blätter einzeln auf dem Objektträger präpariert oder ein Stillstand der Strömung in den relativ großen Zellen konnte schon an den frei in der Lösung schwimmenden Blättern bei geeigneter Lage festgestellt werden.

Für die wenigen Versuche, die angestellt wurden, um zu zeigen, daß bei der Schädigung der Versuchsobjekte das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht belanglos ist, kamen feuchte Kammern zur Anwendung: die Farbstofflösung wird in den von dem aufgekitteten Glasring gebildeten Raum eingefüllt, so daß sie einen etwa 3 bis 6 *mm* hohen Raum vom oberen

Rande her freiläßt und das Versuchsobjekt im hängenden Tropfen beobachtet werden kann. Selbstverständlich wurden in allen Versuchen die entsprechenden Kontrollversuche im Dunkeln aufgestellt, auch solche, wo reines Leitungswasser verwendet wurde.

Die Temperatur der Lösungen schwankte in meinen Untersuchungen von 12 bis 25° C., wenn sämtliche Versuche berücksichtigt werden, wie sie vom Frühjahr bis in den Herbst durchgeführt wurden. Die meisten der vorliegenden Versuche sind in den Sommermonaten ausgeführt, weil während dieser die Lichtverhältnisse natürlich am günstigsten waren. Selbstverständlich sind nur jene Versuchsergebnisse vergleichbar, die zur gleichen Zeit und damit zur gleichen Temperatur angestellt wurden; geringe Temperaturunterschiede von 1 bis 2°, wie sie zwischen Licht- und Dunkelkulturen auftraten und wegen der größeren Absorption des Lichtes in den Lösungen ohne besondere Vorsichtsmaßregel auch kaum zu vermeiden sind, spielen gewiß keine Rolle und das um so weniger, als ja immer eine größere Reihe von Küvetten gleichzeitig aufgestellt war und je zwei mit der gleichen Farbstofflösung übereinander zu stehen kamen. Um individuelle Verschiedenheiten möglichst auszuschalten, wurden immer möglichst viele von den kleineren Versuchsobjekten gleichzeitig und unter den gleichen Bedingungen in einer Küvette dem Licht exponiert.

Bezüglich der Dauer einer Versuchsreihe sei kurz bemerkt, daß bei mikroskopischen Objekten ein Versuch, der nach 8 Stunden ununterbrochener Exposition keine merkbare Wirkung erkennen ließ, als abgeschlossen betrachtet wurde. Längere Zeit, tagelang, aber standen Versuche, in welchen makroskopisch große Objekte verwendet wurden; dabei konnte tagsüber durch eine bestimmte Zeit 8 bis 10 Stunden lang Licht einwirken. Dann wurde durch Verschieben der Bretterwand auch das obere Fach des Holzkastens verfinstert, um am nächsten Tage weiterhin durch die angegebene Zeit eine Belichtung vorzunehmen. Um das Schicksal der durch Übertragen der Versuchspflanzen mit in die Lösung gebrachten Dauerzustände pflanzlicher und tierischer Organismen kennen zu lernen, wurden Küvetten absichtlich wochenlang unter Nachfüllen des verdunsteten Wassers stehen gelassen, wobei dann von Zeit zu Zeit eine mikroskopische Untersuchung des reichlichen Detritus vorgenommen wurde, den die faulenden, geschädigten Versuchspflanzen zurückgelassen hatten.

Als Lichtquelle verwendete ich ausschließlich Tageslicht; an den hellen Sommertagen (Juni bis August) das noch recht starke diffuse Tageslicht, während der Herbsttage direktes Sonnenlicht, das von September an natürlich viel weniger intensiv ist und bei Versuchen, die nur kurze Zeit währen sollten, ohne Vorschalten der die Wärmestrahlen absorbierenden Lösung die Versuchsobjekte treffen konnte. Ich betone aber, daß dann gleichzeitig immer mehrere Kontrollversuche aufgestellt waren, wo Versuchsobjekte unter gleichen Bedingungen in reinem Leitungswasser exponiert wurden, um zu sehen, wie dann Licht allein einwirken konnte.

Die Herstellung der Farbstofflösungen wurde für jeden Versuch eigens durch Verdünnen einer Stammlösung vorgenommen.

Da schon von früheren Untersuchungen her bekannt war, daß Vorbelichten der Lösung diese in einer für eine spätere Einwirkung auf Organismen nicht gleichgültigen Weise beeinflußt, so wurden die Stammlösungen dunkel gestellt. Als Ausgangslösungen wurden 0·001% starke Lösungen der pulverförmigen Farbstoffe in Leitungswasser genommen, und zwar von:

Safranin wasserlöslich,	Neutralrot,
Eosin gelbstichig,	Methylenblau,
Eosin blaustichig,	Fluorescein,
Magdalarot,	Diazoresorcin,
Rhodamin *B*,	Cyanin;

von nichtfluoreszierenden Farbstoffen vergleichsweise ebenso starke Lösungen von Fuchsin und Anilinblau. Alle Farbstoffe sind von Grübler bezogen.

Die hier angeführten Stoffe sind als deutlich fluoreszierend auch von einer deutlichen Wirkung. Da aber bereits innerhalb der verwendeten Farbstofflösung, die verschiedene Zusammensetzung, Fluoreszenzfarbe, Fluoreszenzhelligkeit etc. aufweisen, die photodynamische Wirkung auf lebende Pflanzenzellen sich in deutlicher Abstufung äußert und mit Rücksicht auf Konzentration. Versuchsobjekte und die bereits oben angeführten Fragen eine weitgehende Variation in der Versuchsanstellung möglich war, so wurde von der Verwendung einer größeren Anzahl von Farbstoffen Abstand genommen.

Als Versuchsobjekte wurden verwendet von:

Algen: *Spirogyra* sp. (meist die kräftige *Sp. crassa*), *Hydrodictyon utriculatum* (ausgewachsene Netze), *Cladophora* sp., *Nitella flexilis* und *N. syncarpa*;

phanerogamen Wasserpflanzen: *Elodea canadensis* (ganze Sprosse und einzelne Blätter), *Ceratophyllum submersum* (ganze Sprosse);

phanerogamen Landpflanzen: abgeschnittene Blätter von *Tussilago farfara* und *Tropaeolum majus*, abgeschnittene Zweige von *Berberis vulgaris*, von *B. vulgaris* eine rotblätterige Varietät, die Blätter durch starken Anthokyangehalt intensiv rot gefärbt, ferner etiolierte und grüne Blätter von *Phaseolus*, *Zea Mays*, ebenso einzelne Gewebestücke (Epidermis und Mesophyll von *Tradescantia*-Blättern.

Vergleichsweise wurden auch bei meinen Untersuchungen tierische Objekte berücksichtigt, und zwar bei den Untersuchungen über das verschiedene Verhalten chlorophyllführender und -freier Zellen, beziehungsweise Gewebe. Es standen mir zur Verfügung als chlorophyllführend

Paramaecium bursaria und *P. caudatum* (chlorophyllfrei),
Hydra viridis und *H. fusca* (chlorophyllfrei),
Stentor viridis und *St. coeruleus* (blau!!, chlorophyllfrei).

Ein für das Studium der photodynamischen Wirkung sehr geeignetes und am Lande sehr leicht zu beschaffendes Material fand ich ferner in *Euglena*-Formen.

Kriterien der eingetretenen Wirkung. Das sicherste Mittel ist natürlich die fortlaufende Kontrolle im Mikroskop und bei Versuchen über

Plasmaströmung oder bei Verwendung mikroskopisch kleiner Versuchsobjekte wurde auch diese durchgehends angewendet. Bei Sprossen von *Elodea* ist eine Schädigung der Blätter schon makroskopisch beim Herausnehmen aus der Lösung leicht zu konstatieren: die vorher turgeszent vom Stengel abstehenden Blätter liegen dann schlaff dem Stengel an und sind entweder im Farbenton der Lösung gefärbt oder nur schwach gebräunt durch den getöteten Zellinhalt.

Als eine sehr feine Reaktion, die insbesondere bei mikroskopischer Untersuchung den Beginn einer eintretenden Schädigung festzustellen erlaubt, kann — mit einer gewissen Einschränkung — das Fortdauern, beziehungsweise das Sistieren der Plasmaströmung gelten. Starke Schädigung bedingt in den Zellen nicht zu übersehende Strukturänderungen, wie Schrumpfung, Vakuolisation oder starke Färbung von Plasma und Kern.

Ist Färbung eingetreten, so muß diese, wenn sie als Zeichen einer Schädigung gelten soll, immer mikroskopisch festgestellt werden, denn es kann eine makroskopisch recht deutliche Tinktion erreicht sein, die lediglich auf Farbstoffspeicherung in den äußeren Membranen beruhen kann.

Nach diesen Ausführungen darf ich es nicht unterlassen, auf einen wichtigen, für die Beurteilung der Wirkung und für einen Vergleich der einzelnen Versuche wesentlichen Punkt hinzuweisen. Es ist das oft sehr ungleichmäßige Reagieren der Versuchsobjekte bei vollständig gleichen äußeren Bedingungen. Wenn man einheitliche Versuchsergebnisse erzielen will, dann muß das Material zur gleichen Zeit gesammelt sein und gleiche Vorbehandlung erfahren haben. So standen z. B. frisch gesammelte *Elodea*-Sprosse durch 4 bis 5 Tage vorerst im Laboratorium, ehe sie im Versuch verwendet wurden.

Ein sehr empfindliches Objekt ist *Spirogyra*; mechanische Schädigung ist hier besonders zu vermeiden.

Trotz alledem werden individuelle Verschiedenheiten in jedem Versuch auftreten und der Grad der Schädigung kann nur durch Schätzen der Zahl der geschädigten Zellen bestimmt werden.

Auf Einzelheiten soll in den Diskussionen der Versuchsprotokolle eingegangen werden.

B. Versuche über den Nachweis der photodynamischen Erscheinung bei Anwendung einer 0·001 prozentigen Eosinlösung.

Versuchslösung: 0·001 prozentige Lösung von Eosin, je 250 cm^3 davon in einer Küvette mit Vorlage zur Absorption der Wärmestrahlen. Temperatur durchschnittlich 20°.

Versuchs-pflanzen	Schädigung nach Stunden bei Belichtung	Bemerkungen
I. *Elodea*-Sprosse	Beginn der Schädigung nach 30 Stunden; einzelne Blätter sind stellenweise getötet; nach 70 Stunden noch viele Zellen in anscheinend gefärbten Blättern intakt; nach 5 Tagen die ganze Pflanze tot.	diffuses Licht
II. *Elodea*-Sprosse	10 stündige Belichtung ergibt die ersten Zeichen der Schädigung (mikroskopische Kontrolle!!), 15- bis 25 stündige schon weitgehende Schädigung vieler Zellen des Blattes; am dritten Versuchstag die Pflanze tot.	direktes Sonnenlicht
III. *Elodea*-Sprosse (junger Sproß)	10- bis 15 stündige Belichtung ergibt die ersten Zeichen einer Schädigung; Squamulae bereits getötet; nach 48 Stunden die Pflanze tot.	direktes Sonnenlicht
IV. *Spirogyra crassa*	Die Schädigung beginnt nach 4 bis 6 Stunden; nach 12 Stunden die meisten Fäden tot. Nach 36 stündiger Versuchsdauer alle Fäden geschädigt.	diffuses Licht
V. *Spirogyra crassa*	Nach 8 Stunden viele Fäden tot, nach 24 Stunden im Lichte alle geschädigt.	direktes Sonnenlicht
VI. *Spirogyra crassa*	Nach 10 Stunden erst Beginn der Schädigung, nach 36 Stunden komplette Wirkung.	direktes Sonnenlicht
VII. *Ceratophyllum submersum*	Nach zirka 50 bis 60 Stunden Schädigung einzelner Quirle. Auch nach 8 Tagen noch einzelne Sprosse stellenweise lebende Gewebe enthaltend, nach 12 tägiger Versuchsdauer alles getötet.	diffuses Licht
VIII. *Ceratophyllum submersum*	Nach 30 Stunden viele Blätter angegriffen, nach 50 Stunden weitgehende Schädigung.	direktes Sonnenlicht
IX. *Hydrodictyon utriculatum* (junges Netz)	Beginn der Wirkung nach 6 Stunden, nach 12 Stunden viele geschädigt, nach 24 Stunden Belichtung alle Zellen abgestorben.	direktes Sonnenlicht
X. *Hydrodictyon utriculatum*	Beginn der Schädigung nach 15 Stunden; vollständige Schädigung nach 2 Tagen.	diffuses Licht
XI. *Symphoricarpus racemosus*, isolierte Zellen der Beere	Beginn der Schädigung nach 1 bis $1^1/_2$ Stunden; nach 6 Stunden bereits alle Zellen geschädigt, Kerne durchfärbt, ebenso das Plasma.	direktes Sonnenlicht

Versuchs-pflanzen	Schädigung nach Stunden bei Belichtung	Bemerkungen
XII. *Symphoricarpus racemosus*	Komplette Schädigung nach 10 Stunden.	starkes diffuses Tageslicht
XIII. *Tradescantia* sp. (Epidermiszellen)	Beginn der Schädigung nach 3 bis 5 Stunden. Die meisten Zellen geschädigt nach 8 Stunden.	direktes Sonnenlicht
XIV. *Tradescantia* sp. (Epidermiszellen)	Die meisten nach 12 Stunden geschädigt.	starkes diffuses Licht

In allen diesen Versuchsreihen entsprechenden Kontrollen im Dunkeln setzt eine Schädigung durchschnittlich um 12 bis 24 Stunden später ein. Bei kräftigeren Objekten wie *Elodea*, *Ceratophyllum* ist eine Schädigung erst 2 bis 3 Tage nach einer Schädigung in belichteten Versuchen zu konstatieren. Im reinen Leitungswasser bleibt sie innerhalb der Zeit von einer Woche sowohl im Licht als auch im Dunkeln aus.

Aus den oben zusammengestellten Resultaten von Versuchen mit verschiedenen pflanzlichen Zellen und Geweben, die der Einwirkung einer deutlich fluoreszierenden Eosinlösung ausgesetzt waren, ergibt sich vor allem, daß unter den angeführten Versuchsbedingungen eine ausgesprochene photodynamische Wirkung stattfindet: Im Licht erfolgt die Schädigung merklich früher als in den Dunkelversuchen; Versuchsobjekte in reinem Leitungswasser bleiben natürlich während der Zeit im Licht ebenso wie im Dunkeln völlig intakt. Wenn der zeitliche Verlauf der photodynamischen Wirkung auf pflanzliche Objekte gegenüber der Wirkung auf tierische Objekte vergleichsweise betont wird, so ist vor allem die größere Widerstandskraft pflanzlicher Zellen und Gewebe auffallend. Abgesehen davon, daß für die meisten Versuche der Tierphysiologen das ohnehin sehr empfindliche Infusor *Paramaecium* Verwendung findet, dürften Verschiedenheiten auch durch verschiedene Organisation pflanzlicher und tierischer Zellen bedingt sein. Fehlen oder Vorhandensein einer Zellmembran ist dabei gewiß von Einfluß. Ein so zartes Objekt wie *Paramaecium* ist mit den äußersten Schichten des Plasmakörpers mit der

Lösung in innigster Berührung, die durch die ständige Wimperbewegung noch erhöht wird. Der Plasmakörper einer typischen pflanzlichen Zelle ist durch eine mehr oder minder starke Zellhaut von der Außenwelt abgeschlossen: wenn ein Stoff auf den Plasmakörper wirksam sein soll, so muß er nach Diffusion durch die permeable Zellhaut noch auf osmotischem Wege die semipermeable Plasmahaut passiert haben — eventuell destruiert haben — ehe er seine volle Wirkung im Inneren entfalten kann. Schon beim Durchgang durch die Zellhaut wird ein großer Teil des Farbstoffes absorbiert, was sich z. B. bei Eosin durch intensive Rotfärbung der Membran zeigen läßt. Dazu kommt, daß das verwendete Eosin kein ausgesprochener Vitalfarbstoff ist[1] und die lebende Zelle dem Durchtritt von Farbstoffen großen Widerstand entgegensetzt. Die empfindlichsten Objekte unter den pflanzlichen Zellen waren in meinen Versuchen isolierte Zellen aus dem Fruchtfleisch der Schneebeere *Symphoricarpus racemosus*; es sind äußerst dünnwandige, plasmareiche Zellen und ihre Empfindlichkeit gegenüber der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Farbstofflösungen steht der Empfindlichkeit tierischer Versuchsobjekte nicht viel nach. Das gilt nicht nur für den zeitlichen Verlauf, sondern auch für eine eintretende Schädigung bei weitgehender Verdünnung der verwendeten Lösungen. Die derbe Membran der Epidermiszellen von *Elodea*-Blättern zeigt besonders am Querschnitt intensive Rotfärbung, ebenso erfolgt geringe Farbstoffspeicherung in den Schleimscheiden von *Spirogyra*-Fäden. Ganz vereinzelt stehen die hohen Werte in Versuchen von Jodlbauer und v. Tappeiner, wo von pflanzlichen Zellen Bakterien und Pilze herangezogen wurden: eine deutliche Schädigung erfolgt erst nach 5 bis 8 Tagen auch bei relativ großen Konzentrationen.

Schon bei den ersten orientierenden Versuchen konnte bei einer mikroskopischen Kontrolle sowohl belichteter als auch verdunkelter Blätter oder Sprosse von *Elodea* nach eingetretener Schädigung eine auffallende Erscheinung beobachtet werden, die ich später oftmals wiedergefunden habe. Es treten, wie

---

[1] Siehe p. 1249.

schon früher bemerkt wurde, individuelle Verschiedenheiten auch an Zellen des gleichen Blattes auf und dabei trifft es sich oft, daß noch intakte Zellen oder Zellgruppen von einem Komplex getöteter Zellen allseitig umgeben sind. Die noch lebenden Zellen zeigen dann bei Untersuchung im reinen Wasser eine äußerst lebhafte Plasmaströmung, wie man sie bei gewöhnlicher Präparation durch Wundreiz beim Abzupfen des Blattes mit einer Pinzette und Übertragen in Wasser nur ausnahmsweise in dieser Intensität wird beobachten können.

Sehr charakteristisch ist in allen Fällen das mikroskopische Bild der beginnenden oder der eingetretenen Schädigung. Bei Verwendung von Paramäcien äußert sich die Wirkung besonders auf die Art der Bewegung: In den letzten Stadien der Wirkung erblickt man die Infusorien in taumelnder Bewegung, oft werden ganze Stücke des Plasmaleibes ausgestoßen[1] und schließlich erfolgt vor den Augen des Beobachters ein Zerfließen des Zellkörpers; der Kern bleibt längere Zeit deutlich gefärbt sichtbar. Bei den pflanzlichen Zellen ist sowohl der Beginn als auch die Form der Schädigung des Plasmakörpers sehr einheitlich, es sind immer die charakteristischen »Desorganisationsmerkmale« der Struktur des Plasmas, wie sie von Klemm (29.) eingehend studiert wurden: Vacuolisation, besonders der peripheren Plasmapartien, dann Körnelung im Cytoplasma und schließlich Schrumpfung des ganzen Zellinhaltes, wobei intensive Farbstoffspeicherung, besonders im Kern auftritt. Um den Anfang der Wirkung ziemlich genau feststellen zu können, ist *Spirogyra* besonders geeignet.

Bei der sehr kräftigen *Sp. crassa* zeigt die Zelle im intakten Zustand mehrere breite Chlorophyllbänder, deutliche große Pyrenoide und einen in feinen Plasmafäden in der Zellmitte »aufgehängten« Kern, der von spindelförmiger Gestalt ist und mit seiner Längsachse senkrecht zur Längsache der Zelle orientiert ist. Verfolgt man den Verlauf der Schädigung durch mikroskopische Kontrolle in Intervallen in $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde,

[1] Bei solchen Beobachtungen ist es mir oft aufgefallen, daß niemals der kernlose Plasmateil sich bewegte. Durch das oben erwähnte Ausstoßen von Plasmapartien kann ein Paramäcium oft nur die Hälfte der ursprünglichen Größe zeigen, aber immer noch ist dieser Teil kernhaltig und lebhaft beweglich.

so fällt nach einer ein- bis zweistündigen (Mittelwerte!) Versuchsdauer die Deformation der Chlorophyllbänder und die des Kernes auf. Die vorher scharf zackig begrenzten Bänder werden eigenartig blasig, reißen oft stellenweise auseinander und schließlich sind Chlorophyllbänder und angrenzende Plasmaschichten fein vacuolig geworden, dabei aber nicht durch den Farbstoff deutlich tingiert; die Zelle ist noch lebend, wenn als Kriterium dafür das Gelingen der Plasmolyse durch NaCl, Zucker oder Glycerin in hypertonischer Konzentration betrachtet wird. Die Veränderungen des Zellkernes sind gleichfalls charakteristisch und setzen besonders bei Versuchen, wo *Spirogyra* im Dunkeln längere Zeit in der Lösung verweilt hatte, um nachträglich erst belichtet zu werden, noch früher ein als die eben erörterten Strukturänderungen der Chlorophyllbänder.

Der lange spindelförmige Kern verkürzt sich, die Kernmembran hebt sich blasig ab und eine deutliche Tinktion durch den eingedrungenen Farbstoff ist besonders auffallend mit Rücksicht auf die Fragen nach dem Ort des Angriffes der beginnenden Schädigung durch die Kombination von Licht + fluoreszierender Farbstofflösung und die Möglichkeit der vitalen Kernfärbung, eventuell Tötung des Kernes unter Lebenderhaltung des Plasmas. Diese Fragen werden auf p. 1249 eingehender erörtert.

Bei den übrigen Objekten ist die Schädigung, wie schon erwähnt, in einer strukturellen Veränderung leicht kenntlich und recht gleichmäßig. Ähnliche Störungen der Bewegung wie *Paramaecium* zeigt auch *Euglena viridis.*

Wenn auch in den Versuchen individuelle Schwankungen der gleichen Versuchsobjekte auftreten, so ist doch das verschiedene und dabei regelmäßige Verhalten ganz bestimmter Zellen oder Gewebepartien schon in den ersten Versuchen auffallend gewesen. Ein mit der Pinzette losgerissenes Blatt eines Sprosses von *Elodea canadensis* zeigt oft an der Basis noch zwei kleine, schuppenförmige Anhängsel, die in der Morphologie als Squamulae intravaginales bekannt und beschrieben sind. Diese Squamulae waren als die ersten Gewebepartien des ganzen Blattes geschädigt und während die übrigen

Blatteile noch lebhaft grün und lebend waren, waren jene bereits getötet und gefärbt. Es konnte dieses Verhalten einerseits zurückzuführen sein auf die zartere Organisation der Squamulae, andrerseits der Mangel von Chlorophyll als Grund der geringeren Widerstandskraft in Betracht kommen. Um darüber zu entscheiden, wurden verschiedene andere Objekte, und zwar gleichzeitig chlorophyllfreie und chlorophyllhaltige zu den Versuchen verwendet, deren Ergebnis in nachstehender Tabelle zusammengestellt ist.[1]

C. Versuche mit chlorophyllfreien und chlorophyllhaltigen Organismen, Zellen und Geweben.

Diese Versuche zeigten sehr deutlich, daß chlorophyllhaltige Zellen, Gewebe oder Organismen der Schädigung photodynamisch wirksamer Farbstofflösungen gegenüber ausgesprochen widerstandsfähiger sind als chlorophyllfreie. Bei der photodynamischen Wirkung beobachten wir das gleiche Verhalten der Organismen, wie es allgemein von der Einwirkung strahlender Energie gilt. So war in den Versuchen von Hertel (31) die chlorophyllhaltige *Hydra viridis* gegenüber der Bestrahlung mit ultraviolettem Lichte von 280 $\mu\mu$ Wellenlänge widerstandsfähiger als die farblosen *H. fusca* und *H. grisea*. Bei der farblosen Form der *Hydra* erfolgt nach Bestrahlung sofort Kontraktion der Tentakel, nach ungefähr 1 Minute ist vollständige Bewegungslosigkeit eingetreten. Dagegen zeigt *H. viridis* nach 2 bis 3 Sekunden langer Einwirkung des Lichtes Kontraktion der Tentakel und des ganzen Körpers und erst eine 6 bis 8 Minuten lange Einwirkung kann eine dauernde Schädigung herbeiführen.

Ähnliches zeigen Versuche von Willcock (15.), der chlorophyllhaltige Paramäcien (*P. bursaria*) und chlorophyllose

[1] Ich bemerke dazu, daß in dieser Tabelle Versuche, die zu verschiedener Zeit ausgeführt wurden, der Einheitlichkeit halber zusammengefaßt sind, da mit Rücksicht auf das Material die gleichen Fragen zu verschiedener Zeit beobachtet wurden und umgekehrt bei günstigem Material, wie ich es namentlich während des Ferienaufenthaltes zur Verfügung hatte, dann die verschiedenen einschlägigen Fragen an gleichen Versuchsobjekten studiert wurden. Das gilt für alle in der Arbeit angeführten Versuchsprotokolle.

Versuchsobjekte: *Hydra viridis* und *H. fusca.*

Lösungen: 0·0005 prozentig.

I. Eosin, II. Magdalarot, III. Fluorescin, IV. Rhodamin *B*, V. Safranin, VI. Kontrolle mit H_2O allein, VII. Methylenblau, VIII. Neutralrot.

	Im Lichte tritt eine Schädigung ein nach Stunden							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Hydra viridis	*a)* 1 1/2 bis 2	2 bis 3	6 bis 8	1 1/2 bis 2	2 bis 3	keine Schädigung	5 bis 8	5 bis 8
	b) 2 bis 2 1/2	2 bis 3	10	4 bis 5	2 bis 3	keine Schädigung	10	8 bis 10
	a und *b* Versuche im direkten Sonnenlicht (Vorlage!)							
Hydra fusca	*a)* 20 Minuten vollständig geschädigt	1/2 Stunde vollständige Schädigung	2 bis 3	1/2 bis 3/4	20 Minuten vollständige Schädigung	keine Wirkung	2 bis 4 Stunden vollständige Schädigung	3 bis 4 Stunden vollständige Schädigung
	b) 20 Minuten vollständig geschädigt	1	4 Stunden vollständig geschädigt	1	1/2 bis 1	keine Wirkung	2 bis 4 Stunden vollständige Schädigung	3 bis 4 Stunden vollständige Schädigung
	Ebenfalls direktes Sonnenlicht							

Versuchsobjekte: *Paramaecium aurelia* und *P. caudatum.*

Lösungen: 0·0005prozentig.

I. Eosin, II. Magdalarot, III. Fluorescin, IV. Rhodamin *B*, V. Safranin, VI. Kontrolle in reinem H_2O, VII. Methylenblau, VIII. Neutralrot.

		Im Lichte tritt eine Schädigung ein nach Minuten							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Paramaecium aurelia	*a)*	30 bis 60	1 Stunde	4 bis 6 Stunden	2 Stunden	1 Stunde	keine Wirkung	6 bis 8 Stunden	6 bis 8 Stunden
	b)	60	1/2 bis 1 Stunde	4 bis 6 Stunden	1 Stunde	1/2 bis 1 Stunde	keine Wirkung	5 bis 8 Stunden	6 bis 8 Stunden
		a und *b* Versuche im direkten Sonnenlicht (Vorlage!)							
Paramaecium caudatum	*a)*	3 bis 10	15	60 bis 120	30 bis 60	15	keine Wirkung	1 1/2 bis 2 Stunden	2 Stunden
	b)	10	10	60 bis 80	30 bis 60	15	keine Wirkung	2 Stunden	2 Stunden
		a und *b* Versuche im direkten Sonnenlicht (bei Vorlage zur Absorption der Wärmestrahlen)							

P. caudatum der Radiumstrahlung aussetzte. Erstere sind noch nach einer drei- bis viertägigen Versuchsdauer lebend und teilungsfähig, die letzteren zerfließen dagegen schon nach dreistündiger Einwirkung.

Das Bild der Schädigung der *Hydra* in meinen Versuchen ist recht charakteristisch: Nach dem Übertragen in die Schälchen mit den Versuchslösungen zeigten die Tiere lebhafte Bewegungen der Tentakel, die auf eine Erschütterung des Versuchsgefäßes hin sofort eingezogen werden. Nach zwei- bis dreistündiger Einwirkung der Lösung bei starkem diffusen Lichte bleiben die Tentakel dauernd eingezogen, der Körper ist buckelig gewölbt und in diesem Zustand reagieren die Tiere nicht mehr auf Erschütterung, wohl aber auf direkte Berührung mit einer Capillare oder Nadel. Nach sechs- bis zehnstündiger Einwirkung sind nur mehr lose, gefärbte Stücke der *Hydra* sichtbar, die allmählich zerflossen war, wobei zuerst einzelne Zellen unter Abrundung aus dem Gewebeverband sich losgelöst hatten. Das gleiche Bild bietet *H. fusca*, nur daß eine völlige Auflösung in einzelne gefärbte Gewebestücke schon nach einer ein- bis zweistündigen Versuchsdauer erfolgt war. Ebenso reagieren Paramäcien und Stentoren; bei letzteren erfolgt vor dem Zerfließen gleichfalls kräftige Kontraktion; in den getöteten Stücken tritt dann der rosenkranzförmige Kern scharf hervor.

Die Tiere in den Dunkelkulturen sind nach 12 Stunden noch lebend und deutlich reizbar.

Das auffällige Verhalten der chlorophyllfreien und -haltigen Hydren ist bereits bei Untersuchungen über vitale Färbung des Nervensystems von Hadži beobachtet worden, ohne daß er den Grund für diese Erscheinung anzugeben wüßte. Der genannte Autor berichtet in seiner Arbeit (41), daß Erfolge nur bei *H. fusca* und *H. viridis* zu erzielen sind, wenn die Färbung im Dunkeln nach längerer Einwirkung stattfindet. Bei Belichtung werden die Versuchstiere getötet, wobei *H. viridis* ausgesprochen widerstandsfähiger ist. Für diese Untersuchungen wurden die als gute Vitalfarbstoffe bekannten Lösungen von Methylenblau, Neutralrot und Nilblauchlorid verwendet, die bei allen bisherigen Versuchen als photodynamisch stark wirksam

gefunden wurden. Als durch photodynamische Schädigung hervorgerufen sind gewiß auch die Angaben von Jacques Loeb (7) anzusehen, der gleichfalls Neutralrot und Methylenblau zur Vitalfärbung von Seeigeleiern ungeeignet fand, wenn die Lösungen stärkerem Lichte ausgesetzt waren.

Die Erklärung für das so verschiedene Verhalten chlorophyllführender und chlorophyllfreier Organismen, Zellen oder Gewebe soll nach Hertel (30, 31) dahin zu geben sein, daß das Licht, besonders das ultraviolette, durch Reduktionswirkung das lebende Plasma schädigt. Grünes Gewebe, das bei Lichtzutritt durch die Assimilationstätigkeit freien O abgibt, vermag längere Zeit dadurch die reduzierende Lichtwirkung zu paralysieren. Bei der Annahme dieser von Hertel gut begründeten Deutung sollte man bei der photodynamischen Wirkung das Gegenteilige erwarten. Für die photodynamische Wirkung ist freier O erforderlich, dieser wird durch den Assimilationsprozeß geliefert und es wäre ganz gut denkbar, daß bei grünen Objekten die Schädigung früher einsetzen könnte. Dieser Schluß ist aber, wie ich mich durch Versuche überzeugen konnte, nicht zulässig, denn bei Sprossen oder Geweben, die im Dunkeln entstärkt waren, tritt nur minimale oder gar keine Assimilation ein.

Für diese Versuche wurden *Elodea*-Sprosse durch 4 bis 8 Tage im Dunkeln gehalten, zeitweise auf ihren Stärkegehalt durch die Sachs'sche Jodprobe oder durch Jodchloralhydrat unter dem Mikroskop geprüft und dann erst für den Versuch verwendet.[1] Bei Versuchsanstellung in der üblichen Weise ist nach stundenlanger Belichtung im diffusen Lichte mit der Jodchloralhydratprobe in den Spreiten nur sehr vereinzelt autochthone, neu gebildete Stärke nachweisbar, meist überhaupt keine. Ich glaube nicht, daß etwa nur die Fähigkeit der Stärkespeicherung und Stärkebildung ausgefallen war, denn auch der Trichterversuch gibt keine oder nur geringe O-Mengen gegenüber den Kontrollversuchen. Recht auffallende Pflanzen liefert

[1] Das Entstärken der *Elodea*-Sprosse dauert auffallend lange, es konnten dann auch nur die Blätter entstärkt erhalten werden, während auch nach 12- bis 14tägiger Verdunklung die Stengelglieder Stärke führten.

bei längerer Versuchsdauer ein Übertragen in das meist sehr schwach wirksame Fluorescin. Es tritt infolge Unterernährung auch im Lichte lebhaftes Streckungswachstum des Stengels ein, die Blätter bleiben klein und schwächlich, kurz, es bieten die Pflanzen das Bild einer im Licht »etiolierten« Pflanze, wenn man diesen Ausdruck hier anwenden darf. Sehr schwache Eosin- oder Safraninlösungen, ebenso solche von Fluorescin sind hierfür am besten geeignet.

D. Versuche über die Beeinflussung der Plasmaströmung.

Als das beste und sicherste Kriterium der beginnenden Schädigung des Protoplasten ist, wie schon früher erwähnt, das Aufhören der Plasmaströmung anzusehen, wenn sonst günstige Außenbedingungen vorhanden sind. Auch auf die Beeinflussung der Plasmaströmung durch photodynamisch wirksame Farbstofflösungen zu achten, war um so mehr nahegelegt, als wir über die Abhängigkeit der Plasmaströmung vom Licht allein durch Untersuchungen von Kretzschmar (25) und Josing (26) gut unterrichtet sind. Für einschlägige Versuche verwendete ich flache Uhrschalen, in welche die Lösung mit den Versuchsobjekten gebracht wurde; für eine ständige Kontrolle wurden mikroskopische Präparate angefertigt und diese in Intervallen von 10 Minuten beobachtet.

In *Elodea*-Blättern war die Plasmaströmung nach der üblichen Präparationsmethode durch Wundreiz ausgelöst worden; von *Nitella syncarpa* und *N. flexilis* kamen Sprosse mit 4 bis 6 Internodien zur Verwendung, nachdem lebhafte Strömung durch mikroskopische Kontrolle festgestellt war.

Im Dunkeln dauert die Strömung auch nach 12 bis 24 Stunden, oft bis 36 Stunden in den Blättern, die in der Lösung waren, noch weiter.

In allen diesen Versuchen ergab sich, daß die Plasmaströmung durch Einwirkung belichteter fluoreszierender Farbstofflösungen nach 2 bis 4 Stunden im Durchschnitt gehemmt wird. Die Reihenfolge der Wirksamkeit einzelner Lösungen ist die gleiche wie in früheren Versuchen mit ganzen Pflanzen. Stark wirksam sind Eosin, Magdalarot, Safranin, schwächer

Versuchsobjekte: *Elodea*, Blätter; *Vallisneria*, Tangentialschnitte durch die Blätter; *Nitella flexilis*, ganze Pflanzen.

Lösungen: 0·001 prozentig.

I. Eosin, II. Safranin, III. Magdalarot, IV. Methylenblau, V. Neutralrot, VI. Kontrolle.

Versuchs-objekte	Ein Stillstand der Strömung tritt ein nach Stunden						Bemerkungen
	I	II	III	IV	V	VI	
1. *Elodea*, Blätter	1 bis $1^1/_4$	1 bis $1^1/_1$	2 bis $2^1/_2$	6 bis 8	6 bis 8	Fortdauernde Strömung, nach 12 Stunden Belichtung	diffuses starkes Licht
2. *Vallisneria spiralis*, Schnitte	1 bis $1^1/_2$	2	2 bis $2^1/_2$	8	6 bis 8		diffuses Licht
3. *Elodea*, Blätter	$^1/_2$ bis $1^1/_2$	1 bis $1^1/_4$	1 bis $1^1/_2$	4 bis 6	4 bis 6		direktes Sonnenlicht unter Vorlage
4. *Nitella flexilis*	3 bis 5	4 bis 5	4 bis 5	keine Schädigung nach 10 Stunden	keine Schädigung nach 10 Stunden		direktes Licht

wirksam sind Lösungen von Fluorescin, Methylenblau und Neutralrot.

In allen den Fällen konnte eine deutliche, mitunter sehr kräftige Beschleunigung der Plasmaströmung in der ersten Zeit der Einwirkung festgestellt werden, während eine derartig deutliche Steigerung der Intensität der Strömung bei Belichtung in reinem Wasser nicht zu konstatieren war. Nach 2 bis 4, im Maximum 6 Stunden langer Einwirkung wird die Strömung gänzlich sistiert. Ein Stillstand der Strömung kann jedoch weit früher erfolgen als eine dauernde Schädigung; beim Übertragen von Blättern in reines Wasser, auch wenn die Strömung unter dem Einfluß photodynamisch wirksamer Lösungen bereits sistiert war, kehrt die Strömung wieder. Nach einer vitalen Durchfärbung im Dunkeln zeigen Blätter von *Elodea*- oder *Nitella*-Pflanzen bei Belichtung in reinem Wasser

eine kräftigere Strömung, als sie bei den gleichen Versuchsobjekten in reinem Wasser auftritt. Eine photodynamische Schädigung von mit Neutralrot oder Methylenblau durchfärbten Zellen ist dann nur bei sehr kräftiger Durchleuchtung mit direktem Sonnenlicht zu sehen; im gewöhnlichen diffusen Lichte tritt die Wirkung nicht oder nur sehr spät ein, so daß der Unterschied gegenüber belichteten und unbelichteten Versuchsobjekten nicht sehr deutlich hervortritt.

Die Tatsache, daß die Plasmaströmung durch die Einwirkung von Licht + fluoreszierender Farbstofflösung zuerst stimuliert wird, ehe eine dauernde Schädigung eintritt, steht im Einklang mit einer Reihe von Versuchen über Giftwirkung im allgemeinen. Bei genügend weitgehender Verdünnung geht in allen diesen Fällen (Pfeffer, 8) einer Schädigung eine Stimulation irgendeiner Lebenserscheinung oder eines einzelnen chemischen Prozesses voran. Auf diese Beobachtungen soll mit Rücksicht auf spätere Erörterungen hingewiesen werden (p. 1247), wo angeführt werden soll, daß wir in der photodynamischen Erscheinung nicht nur Lichtwirkung allein, sondern gleichzeitig eine durch Belichtung gesteigerte Giftwirkung zu sehen haben.

Die Tatsache, daß unter dem Einfluß fluoreszierender Lösungen die Plasmaströmung im Lichte gehemmt wirke, erhellt auch aus den Versuchen von v. Portheim (27). Diese Untersuchungen, die die Frage über eine eventuelle Entgiftung des Chinins durch Salze behandeln, haben in vielen Fällen eine raschere Sistierung der Strömung bei Belichtung ergeben. Da auf die photodynamische Wirkung, die dabei in Betracht kommen konnte, nicht Rücksicht genommen wurde und außerdem systematische Untersuchungen unter Betonung dieser Erscheinung außerhalb des Planes der genannten Arbeit gelegen waren, so sind die Versuchswerte, wie sie in den Tabellen dieser Arbeit niedergelegt sind, auch nicht gleichmäßige gewesen. Jedenfalls aber hebt v. Portheim die Beobachtung, daß im Licht unter der Einwirkung von Chinin früher eine Hemmung der Plasmaströmung einsetzt als im Dunkeln, ausdrücklich hervor, wenn auch in einzelnen Fällen gegenteilige Resultate in dieser Untersuchung verzeichnet sind.

E. Beobachtungen bei längerer Versuchsdauer von exponierten Lösungen.

In den bisher vorliegenden Arbeiten der Tierphysiologen sind die Versuche nach eingetretener Schädigung der Versuchsobjekte — und als solche sind ja meist Paramäcien verwendet worden — als beendigt angesehen worden. Wie schon früher hervorgehoben wurde, kam es mir in meinen Versuchen unter anderem auch darauf an, das Verhalten von Organismen oder von Dauerzuständen pflanzlicher und tierischer Formen kennen zu lernen, die nachträglich in der Lösung eventuell sich entwickeln würden. Es wurden deshalb Küvetten mit *Elodea*-Sprossen oder ganzen Pflanzen von *Ceratophyllum submersum* auch nach eingetretener Schädigung dieser Objekte weiterhin dem Licht exponiert und zeitweise mit den unter gleichen Versuchsbedingungen gehaltenen, aber dunkelgestellten Kulturen verglichen. Es haben sich dabei einige Tatsachen ergeben, die mir mit Rücksicht auf die allgemeine Auffassung der photodynamischen Wirkung von Interesse zu sein scheinen.

Es zeigte sich nämlich, daß in allen Lösungen, besonders aber in jenen von Rhodamin *B* und von Safranin (wasserlöslich) bereits 6 bis 8 Tage nach dem Absterben der Versuchspflanzen Infusorien, Amöben und Algenschwärmer sich zu entwickeln beginnen, ohne daß sie auch bei intensiver Belichtung ohne Vorlage zur Absorption der Wärmestrahlen in irgendeiner sichtbaren Weise geschädigt werden. Von den auftretenden Infusorien sind es besonders kleine Ciliaten, meist *Bodo*-Formen, dann Paramäcien, die zuerst sich einstellen. Nach ungefähr 8 bis 12 Tagen sind jedoch im Bodensatz, den die abgestorbenen Versuchspflanzen hinterlassen haben, in der weitaus größten Zahl Amöben (*Amoeba proteus*) zu finden, oft in solcher Menge, daß im Gesichtsfeld eines mikroskopischen Präparates bei 80facher Vergrößerung (Zeiß, Objektiv 3, Okular III) bis an 100 Individuen zu zählen sind. Nach dieser Zeit, also ungefähr in 14 Tagen nach dem Absterben der Versuchspflanzen, sind an den Wänden sitzend auch ausgekeimte Algenschwärmer von *Oedogonium*-Arten, Conferven und einzelne, aber freischwimmende *Chladophora*-Arten zu finden. Alle diese Algen-

formen zeigen jedoch ein kümmerliches Aussehen; die Fäden sind schmächtiger als jene, die in Kontrollversuchen in reinem Wasser ebenfalls zur Entwicklung kommen, die Chromatophoren sind reduziert und eine Speicherung von Reservestoffen in Form von Stärke, die um die Pyrenoide gelagert erscheint, ist nicht zu konstatieren.

Die Amöben dagegen zeigen normales Aussehen, die Vacuolen sind in Lösungen von Neutralrot, Methylenblau, Safranin, Eosin, Rhodanin etc. durch den aufgenommenen Farbstoff kräftig gefärbt, das übrige Plasma dagegen vollkommen farblos. Amöboide Bewegungen sind sehr lebhaft.

Das Überraschende dieser Befunde liegt darin, daß die Entwicklung der genannten Organismen in sehr kräftig fluoreszierenden Farbstofflösungen bei intensiver Belichtung vor sich geht, auch in sehr hoch konzentrierten Lösungen (1 : 1000 oder 1 : 800!). Es kann also in diesen Fällen bei einer ausgesprochenen Fluoreszenz der Lösung eine photodynamische Schädigung ausbleiben.

Die Erklärung dafür dürfte darin liegen, daß aus den zugrunde gegangenen Versuchspflanzen wasserlösliche organische Verbindungen in Lösung gegangen sind und daß diese die photodynamische Wirkung hemmen oder ganz unterdrücken. Ich kann diesen Erklärungsversuch durch den Hinweis auf die Arbeiten von Busk (zitiert nach I) und Hausmann (22) stützen, wo durch absichtliche Zugabe von Eiweißkörpern zu den Farbstofflösungen eine Schädigung der Versuchsobjekte hintangehalten wird oder fluoreszierende Lösungen von Farbstoffen, deren Eiweißnatur erwiesen ist (Phycocyan, Phycoerythrin) auf Paramäcien keinerlei Wirkung ausüben (Hausmann, 22).

Das spricht sehr dafür, daß wir in der photodynamischen Schädigung der Versuchsobjekte durch das System Licht + fluoreszierende Farbstofflösung nicht nur eine beschleunigte und erweiterte Wirkung des sichtbaren Lichtes zu sehen haben, sondern gleichzeitig eine beschleunigte Wirkung der Farbstofflösung, die allerdings nach späterer Zeit auch im Dunkeln eine »Giftwirkung« entfaltet.

Daß durch Lichtzutritt die »Giftwirkung« beschleunigt werden kann, erhellt aus Versuchen, wo giftige, aber gewiß nicht fluoreszierende Stoffe »photodynamisch« wirksam sind, wenn man das Wort und den Begriff auch dahin erweitern darf. Noch bevor mir die Untersuchungen von Kisch, auf welche sogleich hinzuweisen ist, bekannt waren, konnte ich eine stärkere Schädigung von Paramäcienkulturen in reinstem destillierten Wasser bei Lichtzutritt feststellen. Das von mir verwendete destillierte Wasser war durch Überdestillieren von Wiener Leitungswasser durch einen Platinkühler in nach Molisch's Methode ausparaffinierte Kolben gewonnen. Von diesem Wasser kamen je 100 cm^3 in Küvetten und diese wurden nach Übertragen der Versuchsobjekte (Paramäcien) nach der schon früher angegebenen Weise zum Teil dem Licht exponiert, zum Teil dunkel gestellt. Es zeigte sich in diesen Versuchen, daß destilliertes Wasser bei intensiver Belichtung nach 30- bis 50stündiger Versuchsdauer ausgesprochen schädigend auf Paramäcien wirkte, während die Infusorien bei Verdunklung oder in reinem Leitungswasser intakt bleiben. Bei Verwendung von pflanzlichen Objekten waren keine einheitlichen Resultate zu erzielen, vor allem mit Rücksicht auf die längere Versuchsdauer, die erforderlich ist, um ein Absterben der Versuchspflanzen zu erreichen. Innerhalb der Zeit von 6 bis 8 Tagen sind auch die dunkelgestellten Pflanzen sehr geschwächt und nicht mehr intakt. Eine Plasmaströmung ist an Blättern von *Elodea,* die von solchen Pflanzen losgerissen werden, nicht mehr zu erzielen, auch nicht bei leichter Erwärmung oder günstiger Belichtung in gewöhnlichem Leitungswasser.

Diese Versuche ergaben bei Verwendung von destilliertem Wasser also das gleiche Resultat, wie es Szücs und Kisch (42) bei Anwendung von Alkohol allein oder bei Kombinationen von Alkohol + Eosin, Alkohol + Methylenblau, 0·681 normale $Ca(NO_3)_2$ + Eosin erzielt hatten. Einerseits wirkte in diesen Versuchen Alkohol allein auf Paramäcien im Lichte schädigend, wobei diese Wirkung durch geringe Farbstoffmengen weitgehend gesteigert werden kann und dann in ihrer Intensität die einzelnen Komponenten weit übertrifft.

Alle die angeführten Fälle weisen deutlich darauf hin, daß wir in der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Farbstofflösungen nicht nur reine Lichtwirkung zu sehen haben, sondern die Giftwirkung der Lösung allein durch Belichtung gleichfalls gesteigert wird. Das zeigen einerseits die p. 1244 angeführten Versuche, wo kräftig fluoreszierende Farbstofflösungen auch bei intensiver Belichtung auf Organismen, die in der Lösung sich entwickeln, wirkungslos sind. Andrerseits erhellt das aus Versuchen, wo effektiv nicht fluoreszierende Stoffe, wie Alkohol und destilliertes Wasser, durch Belichtung gleichfalls schädigend wirken können.

Durch die Möglichkeit, photodynamisch wirksame Farbstofflösungen durch Zusatz von löslichen Eiweißkörpern unwirksam zu machen, erinnert die photodynamische Erscheinung an die von Naegeli beschriebene oligodynamische Wirkung von Cu oder anderen Metallen auf so empfindliche Versuchsobjekte, wie es z. B. *Spirogyra*-Arten sind. Die schädigende Wirkung von über Kupferrohre oder solche von Zn überdestilliertem Wasser auf die genannten Versuchsobjekte läßt sich ausschalten, wenn ein Wattebausch oder eine Aufschwemmung von Stärke in das »destillierte« Wasser gebracht wird, so daß auch die letzten Spuren durch Adsorption seitens der Baumwollfäden oder der Stärkekörner entfernt werden.

Welcher Art die Giftwirkung bei der photodynamischen Erscheinung sein könnte, darüber lassen sich nur Vermutungen aussprechen. Es wäre gut denkbar, daß durch Belichtung wirksame Spaltungsprodukte in der Lösung entstehen und diese erst volle Wirksamkeit besitzen.

Andrerseits ist es möglich, daß die gesamten osmotischen Verhältnisse der Zellen oder Veränderungen der Plasmahaut bei Belichtung eine Rolle spielen, indem der Farbstoff oder Spaltungsprodukte desselben leichter oder schwerer in die Zelle einzudringen vermögen, um die zeitlich so verschiedene Wirkung bei Belichtung oder Verdunklung auszuüben.

Genauere Antwort könnte nur eine eingehende Studie über das physikalisch-chemische Verhalten der verwendeten Farbstoffe bei Belichtung bringen und in Ergänzung zu diesen

Ergebnissen vergleichende Untersuchungen über Giftwirkung und deren Abhängigkeit von der Belichtung auf lebende Zellen und Gewebe.

F. Ort des Angriffes der photodynamischen Schädigung.

Auf einschlägige Fragen soll hier nur kurz eingegangen werden. Man unterscheidet nach v. Tappeiner (I) Farbstoffe mit »Innen-« und solche mit »Außenwirkung«. In unseren Fällen sind von den p. 1229 angeführten fluoreszierenden Lösungen Methylenblau, Neutralrot und Eosin von typischer »Innenwirkung«, die übrigen, wie Magdalarot, Fluorescin; Diazoresorcin etc. durch »Außenwirkung« charakterisiert. Die »Außenwirkung« dürfte auf einer Zerstörung der Plasmahaut beruhen, wodurch natürlich die ganze Zelle geschädigt ist, der Farbstoff rasch eindringt und zerstörend wirken kann.

Die »Innenwirkung« von Methylenblau und Neutralrot läßt sich leicht zeigen, wenn in längerer Dunkelkultur Sprosse oder Algen vital durchgefärbt werden, so daß der Farbstoff den Zellsaftraum ausfüllt und solche ganz blaue *Elodea*-Sprosse nach gutem Abspülen einem kräftigen Sonnenlicht ausgesetzt werden (Abfiltrieren der Wärmestrahlen!). Es treten dann, wenn auch später als in der Lösung, die bereits p. 1234 erwähnten Desorganisationserscheinungen auf, die in dunkelgestellten Versuchen unterbleiben.

In Übereinstimmung mit Küster's Angaben (37) konnten sehr auffallende Ergebnisse bei Anwendung von Eosin erzielt werden. Küster hat in seinen Versuchen über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen die photodynamische Wirkung durch Dunkelstellung seiner Versuchsobjekte absichtlich ausgeschaltet, während es mir natürlich darauf ankam, sie möglichst stark hervortreten zu lassen. Als geeignetste Versuchsobjekte fand ich für die gleich anzuführenden Versuche isolierte Zellen von *Symphoricarpus racemosus* (Schneebeere), ferner die große *Spirogyra crassa* und endlich jüngere Blätter von *Elodea densa*.

Werden solche Versuchsobjekte längere Zeit im Dunkeln in einer 0·0001- bis 0·00001 prozentigen Lösung von Eosin

gelassen und starkem Licht exponiert, so konnte in vielen Fällen mit Sicherheit der Kern gefärbt werden, wenn das Plasma noch lebend war und durch hypertonische Lösungen zur Plasmolyse gebracht werden konnte. Bei *Elodea* bot sich nach dem Übertragen in reines Wasser mitunter ein frappierendes Bild: das Plasma mit dem gefärbten Kern war in lebhafter Strömung begriffen. Ich betone dabei ausdrücklich, daß es sich hier nicht um ein dichtes Anlagern von Farbstoffkörnchen an den Kern handelte, wie ich es gleichfalls des öfteren gesehen habe; der Kern war durchscheinend und deutlich tingiert, vom farblosen Plasma mit den Chlorophyllkörnern scharf abgehoben. Solche Färbungen konnten aber nur an einzelnen Zellen von jüngeren Blättern erzielt werden. Öfters ist es bei *Symphoricarpus*-Zellen und *Spirogyra* zu erreichen; bei den genannten beiden Formen ist ebenfalls kräftige Belichtung erforderlich. Woran es liegt, daß diese Färbungen des Kernes nur in vereinzelten Fällen auftreten, vermag ich nicht anzugeben. Jedenfalls sind solche Zellen nicht länger als einen Tag lebensfähig zu erhalten gewesen.

Mit Rücksicht auf die so gründlichen Untersuchungen von Pfeffer und von Fischel (38), die ausdrücklich hervorheben, daß in ihren Versuchen eine »vitale« Kernfärbung niemals zustande gekommen war, glaube ich, daß hier die gleichen Verhältnisse vorliegen. Es sind mir aber doch nur wenige Mittel bekannt, die es ermöglichen, den Kern ohne starke Schädigung des Plasmas zu töten und eventuell durch bestimmte Farbstoffe zu färben. Ich denke da an die Untersuchungen von O. Loew, der primäre Veränderungen und Schädigungen des Kernes durch Zusatz geringer Mengen von Oxalsäure zu *Spirogyra*-Fäden erzielte. Es tritt Schrumpfung und Veränderung des Kernes ein, ohne daß das Plasma sichtbar in dieser Zeit alteriert würde. Ferner erinnere ich an die »Strahlenstichmethode« von S. Tschachotin (43), wo durch Anwendung von konzentriertem ultravioletten Licht ein überaus feiner Strahlenkegel auf das Versuchsobjekt, z. B. eine Zelle, geworfen wird und durch das so wirksame Licht lokal eine Tötung bestimmter Plasmapartien oder auch des Zellkernes erreicht werden kann.

G. Versuche mit Blättern und Sprossen phanerogamer Landpflanzen.

Alle bisher angeführten Untersuchungen beziehen sich auf submerse Pflanzen oder auf Zellen und Gewebe, wobei die letzteren in kleineren Stücken der Einwirkung photodynamisch wirksamer Lösungen ausgesetzt waren. Sollen Teile, z. B. Blätter oder Sprosse von Landpflanzen verwendet werden, so kann es sich nur darum handeln, die Farbstofflösungen aufsaugen und durch die Transpiration im Blatte verteilen zu lassen. Die Vorbereitung zu diesen Versuchen war folgende:

Blätter und Sprosse wurden sofort nach dem Abschneiden ins Wasser gestellt, dann in die Gefäße mit den Versuchslösungen übertragen und längere Zeit hindurch (4 bis 8 Stunden) bei sehr schwachem Licht unter einem Sturz, der oben offen und mit 1 bis 2 Lagen Seidenpapier bedeckt war, gehalten, um die Lösungen im Blatt aufsteigen zu lassen. Nachdem eine deutliche Färbung der Nervatur erreicht war, wurde eine neue Schnittfläche hergestellt, die Blätter in Gläser mit reinem Wasser verteilt (siehe Tafel!) und ein Teil der Gläser dunkelgestellt, der andere Teil dem starken diffusen Licht exponiert. Daneben standen immer Zweige oder einzelne Blätter, die nicht in Farbstofflösungen übertragen waren, als Kontrollversuche.

Durch diese Versuchsanordnung sollte erreicht werden, daß nur die nach einer bestimmten Zeit im Blatte aufgenommene Farbstofflösung wirksam sein sollte. Selbstverständlich kamen bei Verwendung einzelner Blätter, z. B. *Tropaeolum* oder *Tussilago farfara,* möglichst Blätter mit gleich großer Blattspreite zur Anwendung, wo annäherungsweise auch gleiche Farbstoffmengen aufgenommen waren.

Über den zeitlichen Verlauf orientiert die Tabelle auf nebenstehender Seite.

Es läßt sich hier ebenso wie in früheren Versuchen die photodynamische Erscheinung leicht demonstrieren (siehe Tafel!). Die Schnelligkeit der Wirkung ist — abgesehen von der gebotenen Intensität des einstrahlenden Lichtes — von

Versuchsobjekt: *Tussilago farfara.*

Lösung: 0·00005 prozentig.

I. Eosin, II. Rhodamin *B*, III. Magdalarot, IV. Fluorescin, V. Anilinblau, VI. Säurefuchsin, VII. Safranin, VIII. H_2O.

	Schädigung nach Minuten und Stunden							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Tussilago farfara	*a)* 1 Stunde 40 Minuten *b)* 1 Stunde 50 Minuten	3 Stunden 3 Stunden	2 Stunden 2 Stunden 50 Minuten	5 Stunden 5 Stunden	nichts	keine Schädigung	2 Stunden 2 Stunden 50 Minuten	keine Schädigung
	Sonnenlicht							
	Im Dunkeln keine Schädigung (Blattspreite und Blattstiel ist vollständig turgeszent und straff)							

den verwendeten Blättern abhängig in dem Sinne, daß zartere, leicht zu durchleuchtende Blätter schneller geschädigt werden als derbere. Der meist kräftigere Blattstiel bleibt noch längere Zeit, nachdem die Spreite verwelkt ist, turgeszent. Wird durch die geschädigte Blattspreite ein Querschnitt hergestellt und mikroskopisch untersucht, so zeigt sich folgendes Bild: Gefäßbündel (Holzteil!) und angrenzende Scheidenzellen getötet und tingiert — beim Blattstiel auch angrenzende Parenchymzellen oftmals gefärbt, ohne geschädigt zu sein — die übrigen Mesophyllzellen geschrumpft, ohne daß sie gefärbt wären. Schwammparenchym- und Palisadenzellen bieten in diesem Falle das gleiche Aussehen, wie es sonst verwelkte Pflanzen zeigen.

Die Erklärung scheint meines Erachtens darin zu liegen, daß die durch die photodynamische Wirkung getöteten Zellen des Holzteils und der Scheide sich nicht mehr am Saftsteigen, vor allem an der Weiterleitung des aufgenommenen Wassers beteiligen können, daß der durch die Transpiration bedingte Wasserverlust durch neu zugeführtes Wasser nicht gedeckt werden kann und damit das Blatt verwelkt. Es scheint mir das am besten daraus hervorzugehen, daß in einem solchen Blatte, wo die photodynamische Wirkung einzusetzen beginnt und das in eine anders gefärbte Lösung dann übertragen wird, diese nicht mehr bis zur Blattspreite emporsteigt. Nur im Blattstiel ist sie auf kurze Strecken über dem Niveau der Lösung in Blattstielquerschnitten zu erkennen; es ist hier gewiß nur die Kapillarität, die auf geringe Distanz über das Niveau der Versuchslösung, die diese im Blattstiel emporführt.

Das verschiedene Verhalten von anthokyanhaltigen und anthokyanfreien Sprossen von *Berberis* dürfte dahin zu erklären sein, daß erstere durch die gefärbte Epidermis einen großen Teil des Lichtes absorbiert. Erwähnen möchte ich hier den Befund Stahl's (45), daß anthokyanhaltige Blätter stärker transpirieren.

Da es sich in vorliegenden Versuchen nur darum handelte, eine Beeinflussung durch photodynamisch wirksame Farbstofflösungen festzustellen und entsprechend der Versuchsanstellung nur eine bestimmte Menge des aufgenommenen Farb-

stoffes wirksam sein konnte, ist auf diese Angaben keine Rücksicht genommen.

H. Anhang.

Ganz kurz seien noch einige Versuche angeführt, die nicht direkt im Plane meiner Arbeit gelegen waren und wo nur wenige Experimente angestellt wurden. Es ist schon früher (p. 1222 und 1223) hervorgehoben worden, daß sich eine Wirkung der Kombination Licht + fluoreszierende Farbstofflösung auch auf den Verlauf photochemischer, wohl definierter Reaktionen äußern kann. Eine ausgesprochene Lichtreaktion ist nach Molisch (18) die Fällung gewisser Eisensalze, die durch Gegenwart grüner Wasserpflanzen noch beschleunigt werden kann. Dabei kann aber auch unabhängig von einer Fällung das Eisen in Oxydform in der Membran in ganz charakteristischer Verteilung gespeichert werden (siehe p. X der Arbeit und Tafel).

Es lag der Gedanke nahe, zu prüfen, ob die Fällung der Eisensalze als Eisenoxydhydrat durch Zusatz fluoreszierender Stoffe im Lichte nicht beschleunigt werden könnte. Das Ergebnis ist aus nebenstehender Tabelle ersichtlich, wobei Konzentration der Lösung und Versuchsanordnung genau nach Molisch's Angaben gehalten sind.

Lösung: 0·0066 prozentiges zitronensaures Eisenammon. Zu jedem Gefäß mit 250 *cm*³ der Lösung kommen 20 *cm*³ einer einprozentigen Lösung des Farbstoffes, und zwar in der Tabelle angegeben zu

I. Eisensalzlösung + Eosin,
II. » + Safranin,
III. » + Fluorescin,
IV. » + Neutralrot,
V. » + Methylenblau,
VI. » + Magdalarot,
VII. » allein.

Beginn des Versuches 5. Oktober 1913. Temperatur 15 bis 20° C. Lichtverhältnisse: direktes Sonnenlicht ohne Filtervorlage.

Nummer des Gefäßes	Fällung des Eisensalzes nach Tagen im Lichte				
	1	2	5	8	14
I	keine	keine	keine	keine	keine
II	»	»	»	»	»
III	»	»	»	»	»
IV	»	»	deutliche	kräftige	kräftige
V	»	»	keine	keine	keine
VI	»	»	»	»	»
VII	»	»	sehr deutliche	kräftiger brauner Nieder-schlag	wie vorher

Versuchsbedingungen wie oben.

Nummer des Gefäßes	Fällung des Eisensalzes in Tagen im Dunkeln				
	1	2	5	8	14
1	keine	keine	keine	keine	keine
II	»	»	»	»	»
III	»	»	»	»	»
IV	»	»	deutliche	gleichfalls kräftig	ebenso kräftig wie im Lichte
V	»	»	keine	keine	keine
VI	»	»	»	»	»
VII	»	»	»	»	»

Eine Beschleunigung der Fällung dieses Eisensalzes als Eisenoxydhydrat ist unter diesen Bedingungen also nicht zu erzielen. Mit Neutralrot versetzte Lösungen zeigen im Dunkeln ebenso wie im Lichte schon nach eintägiger Versuchsdauer an der Oberfläche die charakteristischen Farbstoffnadeln, wie überhaupt Neutralrot leicht auch aus anderen Lösungen als solche von Eisensalzen ausfällt. In den übrigen Gläsern bleibt ebenso im Lichte wie im Dunkeln das Ausfallen des braunen Niederschlages aus, wie ihn in Übereinstimmung mit Molisch's Versuchen belichtete Lösungen von

zitronensaurem Eisenammon allein schon nach 3 bis 4 Tagen zeigen.

In Dunkellösungen wurde ein Ausfallen des Niederschlages gar nicht beobachtet, da der Versuch früher abgebrochen wurde. Nach Molisch's Angaben tritt eine solche auch nach 25 Tagen nicht ein.

In allen diesen Versuchen ist der Farbstoff der Eisensalzlösung gegenüber anscheinend nicht indifferent, doch wurde die Frage vorläufig nicht weiter geprüft.

Ein sicheres Ergebnis konnte ich aber in Versuchen aufweisen, daß bei gleicher Konzentration und Versuchsanordnung die Lösungen — ohne Farbstoffzusatz — der Einwirkung des ultravioletten Lichtes ausgesetzt waren.

Lösung: 0·0066 prozentiges zitronensaures Eisenammon. 250 cm^3 oder 150 cm^3 Lösung dem Lichte der Quarzglas-Quecksilberdampflampe ausgesetzt.

Nummer des Gefäßes	Datum	Fällung des Eisensalzes nach Stunden der Bestrahlung				
		1	2	4	10 bis 14	30
I	1913 10. Oktober	keine	keine	sehr schwache	deutliche	deutliche
II	» »	»	»	keine	»	»
III	17. »	»	»	»	»	kräftige
IV	» »	»	»	»	»	»
V	» »	»	»	»	»	»
VI	31. »	»	»	»	schwache	»

Kontrollen der gleichprozentigen Lösung zeigen im diffusen Lichte keine Fällung.

Zur Versuchsanordnung bemerke ich noch, daß die Lösungen (je 250 cm^3) in flache Schalen gegossen wurden und dann unbedeckt der Einwirkung des ultravioletten Lichtes der Quarzglas-Quecksilberdampflampe nach Heraeus ausgesetzt waren. Ein Zudecken der Schalen mit Glasplatten muß unterbleiben, da Glas das ultraviolette Licht vollständig absorbiert; die Schalen standen am Tischbrett eines Tisches

in der Dunkelkammer des Institutes direkt unter der Röhre, so daß Licht ungehindert von oben einfallen konnte (Kluyver, 44).

Es tritt in diesen Versuchen also eine Fällung des Eisensalzes in ungefähr doppelt soviel Stunden ein als bei normalem diffusen Lichte oder direktem Sonnenlichte die Fällung Tage währt. Dunkelgestellte Lösungen zeigen keinen braunen Niederschlag.

Dieses Versuchsergebnis war wohl zu erwarten, da ja das ultraviolette Licht die größte chemische Wirksamkeit besitzt, was in den zahlreichen rein chemischen Arbeiten weitgehend ausgewertet wird.

III. Photodynamische Wirkung und Chlorophyllfunktion.

Die einzelnen Studien über die photodynamische Wirkung fluoreszierender Farbstofflösungen, vor allem jene, welche die Wirkung auf lebende Zellen, Gewebe oder Organismen berücksichtigen, bieten in ihren gesamten Resultaten besonders für die Pflanzenphysiologie ein großes Interesse dadurch, daß sie eine sehr gut begründete Deutung der Rolle des Chlorophylls bei der Kohlensäureassimilation auf Grund der auffälligen physikalischen und physiologischen Eigenschaften dieses kräftig fluoreszierenden Farbstoffes geben können. Obwohl eine lückenlose Einsicht in die einzelnen Phasen der CO_2-Assimilation auch heute keineswegs erreicht ist, so sind doch unter Hinweis auf die Ergebnisse von Experimentaluntersuchungen und grundlegender physiologischer Arbeiten, die das Problem der CO_2-Assimilation betreffen, ältere »Assimilationshypothesen« an Bedeutung zurückgetreten. Das gilt für jene, welche in einer ganz einseitigen Weise die Chemie des Chlorophyllfarbstoffes betonen und den Vorgang der Assimilation — natürlich nur in den ersten Phasen — identifizieren mit einer fortwährenden Zerstörung und Neubildung des Farbstoffes bei Lichtzutritt, wobei CO_2 aufgenommen und O abgegeben werden sollte. Das Mengenverhältnis der beiden Gase soll dem experimentell bestimmten Assimilationskoeffizienten gleich sein. Nach diesen Theorien sollte das Chlorophyll direkt beim Assimilationsprozeß beteiligt sein und also

Änderungen im molekularen Aufbau des Farbstoffes bei Lichtzutritt und gegebenen günstigen äußeren Bedingungen das Wesen dieser fundamentalen photochemischen Synthese organischer Stoffe ausmachen.

Gewiß unterliegt der Chlorophyllfarbstoff sowohl im Organismus, gebunden an differente plasmatische Anteile der Zelle, als auch in der Chlorophyllösung außerhalb der Zelle einer steten Zersetzung, aber es ist sicher, daß Chlorophyllbildung und -wandlung ein ganz selbständiger Prozeß ist, von anderen Faktoren abhängig und bedingt als die CO_2-Assimilation. Die Tatsache des ständigen Wandels des Chlorophylls im lebenden Organismus kann auch anders verwertet werden.

Die so auffälligen optischen Eigenschaften des Chlorophylls, die Tatsache, daß für die Assimilation gerade jene Strahlen Verwertung finden, die unter gewöhnlichen Verhältnissen nur geringe oder gar keine Wirksamkeit für das Zustandekommen und den Verlauf photochemischer Reaktionen besitzen, die auffällige Verteilung des Farbstoffes an die Chloroplasten und schließlich das gänzliche Fehlschlagen von Versuchen, mit gelöstem Chlorophyll außerhalb der lebenden Zelle und ohne lebendes Substrat eine dem Assimilationsprozeß gleiche oder ähnliche chemische Umsetzung durchzuführen, alles das findet in diesen Theorien keine Berücksichtigung oder tritt den vorher dargelegten Anschauungen gegenüber ganz zurück.

Gerade diese eben betonten Eigenschaften des Chlorophylls allein und seine Beziehung zum lebenden Substrat werden unter Hinweis auf die Resultate von Studien über die Bedingungen für das Zustandekommen und die Anschauungen über das Wesen der photodynamischen Wirkung in den Mittelpunkt eines Erklärungsversuches gerückt.

Der »Sensibilisationshypothese« werden nicht nur neue Gedanken gegeben, sondern sie erscheint uns heute auf Grund der Untersuchungen über photodynamische Wirkung als die einzig berechtigte und als die einzig mögliche Deutung, die uns eine geschlossene einheitliche Darstellung der Rolle des Chlorophylls beim Prozeß der CO_2-Assimilation geben kann. Die ältere Fassung der »Sensibilisationshypothese«, wie sie

uns in den Arbeiten von Timiriazeff und Engelmann entgegentritt und die in einem Vergleich des intakten Chlorophyllkornes mit der durch Zusatz bestimmter Farbstoffe auch für Licht geringerer Brechbarkeit und größerer Wellenlänge empfindlich gemachten photographischen Platte gipfelt, hat unter dem Hinweis, daß es sich doch nur um einen geistvollen Analogieschluß handle, manchen Einwand erfahren. Dem bekanntesten — und ohne Kenntnis der photodynamischen Erscheinung vielleicht berechtigten Einwand — liegt folgender Gedankengang zugrunde:

Die mit dem Silbersalz imprägnierte Schichte der photographischen Platte ist auch ohne Sensibilisator hochgradig empfindlich, der Sensibilisator erweitert lediglich den wirksamen Strahlenbezirk. Die farblose plasmatische Grundlage des Chlorophyllkornes, das Stroma, ist nachweislich unter keinem Falle befähigt, absorbierte Lichtenergie zur Spaltung der Kohlensäure heranzuziehen, und die Anschauung, daß erst durch das Chlorophyll eine Lichtempfindlichkeit ermöglicht sei, ist wenig wahrscheinlich. In keinem Falle war in der Physiologie etwas Ähnliches bekannt. Aus diesem Grunde ist auch der Versuch, die sensibilisierte photographische Platte sozusagen als Modell eines Chlorophyllkornes zu betrachten, aufzulassen.

Diesem Einwand ist Molisch (18) in seinem schon zitierten Vortrag entgegengetreten mit der Bemerkung: »Der Einwand Jost's erscheint, wenn man das Schwergewicht auf das Wort ‚Sensibilisator‘ legt, nicht unberechtigt, allein mir kommt vor, daß die Verfechter der Sensibilisationshypothese durch ihren Vergleich der photographischen Platte mit dem Chlorophyllkorn hauptsächlich andeuten wollen, daß das absorbierte Licht hier wie dort in ähnlicher Weise zu chemischen Prozessen herangezogen wird, und diese Annahme ist, glaube ich, nicht unstatthaft.« Und mit Rücksicht auf spätere Ausführungen dieses Abschnittes sei aus diesem Vortrag eine zweite Stelle in extenso wiedergegeben, die in klaren knappen Worten das ganze Problem umfaßt und Molisch gleichzeitig als Vertreter der Sensibilisationstheorie kennzeichnet:

»Da im Chlorophyllkorn jeder einfarbige absorptionsfähige Lichtstrahl, von welcher Farbe auch immer, die nämliche rote Fluoreszenzfarbe zwischen *B* und *C* hervorruft (Lommel) und da gerade dieses Licht das assimilatorisch wirksamste ist, so wird das in die grüne Pflanze einstrahlende Licht in außerordentlich ökonomischer Weise ausgenützt und als Vermittler dieser Lichtausnützung müssen Absorption und Fluoreszenz des Chlorophylls hingestellt werden. Das Chlorophyll kann geradezu als eine Fabrik von rotem Lichte bezeichnet werden.«

Seit Molisch in seinem Vortrag in objektiver Weise von der Sensibilisationshypothese als einer »Annahme, die nicht unstatthaft« sei, gesprochen hat, sind in den folgenden Jahren in erster Linie durch die schönen Untersuchungen von W. Hausmann (21.) über die photodynamischen Wirkungen des Chlorophylls wesentliche Fortschritte erzielt worden, die jeden Zweifel darüber, ob ein Vergleich der sensibilisierten photographischen Platte mit dem Chloroplasten zulässig sei, ausschließen. Obwohl bereits in den ersten Publikationen von v. Tappeiner der Gedanke erwogen wurde, daß diese Untersuchungen auch auf die Frage der Rolle des Chlorophylls bei der CO_2-Assimilation anwendbar seien — eine experimentelle Begründung wird nicht gegeben —, hat doch erst Hausmann in voller Schärfe auf Grund seiner ausgedehnten Versuche über die photodynamische Wirkung des Chlorophylls — wobei in üblicher Weise hergestellte Lösungen und solche reiner Präparate Willstätter's verwendet wurden — in einer inhaltsreichen Arbeit die einzelnen Tatsachen zusammengefaßt, die der Sensibilisationshypothese die lange geforderte experimentelle Grundlage bieten können und damit ihre prinzipielle Richtigkeit dartun. Im Interesse einer einheitlichen Darstellung der Frage in diesem Abschnitte seien die wesentlichsten Punkte der Arbeit wiedergegeben.

Vor Hausmann's Arbeiten waren nur wenige Eigenschaften des Chlorophylls bekannt, welche einen berechtigten Schluß auf die Wirksamkeit des intakten Chlorophylls im lebenden Gewebe oder der Zelle gestattet hätten. Die Art der Herstellung der Chlorophyllpräparate macht immer nur ein in

chemischer Hinsicht vom »nativen« Chlorophyll weit verschiedenes Produkt für eine Untersuchung zugänglich. Das sei ausdrücklich betont, weil absichtlich verschiedene Begleitfarbstoffe des Chlorophylls, die im lebenden Organismus bei den so komplizierten chemischen Umsetzungen eine Bedeutung haben dürften, ausgeschieden werden. Die auffälligen optischen Erscheinungen, das Ausbleichen der Lösungen etc. waren auch frühzeitig bekannt geworden.

Hausmann fand nun bei seinen Untersuchungen, daß alkoholische Auszüge grüner Blätter — bei einer späteren Arbeit mit H. v. Portheim auch bei Auszügen etiolierter Blätter — eine kräftige photodynamische Wirkung auf Blutkörperchen und Paramäcien ausüben und daß für diese intensive Wirkung in erster Linie das Chlorophyll verantwortlich zu machen ist. Das Maximum der photodynamischen Wirkung fällt mit dem Absorptionsmaximum der Lösung zusammen und gleichzeitig stellt die enge Linie zwischen *B* und *C* im Spektrum das Maximum der Assimilationsgröße dar.

Phylloporphyrin und Hämatoporphyrin zeigen gleichfalls kräftige Wirkung auf die in der Lösung suspendierten Blutkörperchen und auf Paramäcien, so daß die nahe chemische Verwandtschaft der so interessanten Derivate des Blattgrüns und des Blutfarbstoffes sich auch in ihrem gleichen physiologischen Verhalten dokumentiert.

Die auffallende Ähnlichkeit — Identität? — der Wirkung des Chlorophylls im Reagensglase und jener in der lebenden Zelle ist nicht zu verkennen. Vor allem weist die Art der Verbreitung und Verteilung des Chlorophylls schon auf den innigen Zusammenhang zwischen Photosynthese und photodynamischer Wirkung hin: Hier wie dort ist eine Grundbedingung für das Zustandekommen einer photodynamischen Wirkung erfüllt, nämlich der innige Kontakt zwischen Substrat und Farbstoff, den bezüglich des Chlorophylls jede noch so flüchtige mikroskopische Beobachtung zeigen kann. Ferner fallen Maximum der photodynamischen Wirkung und Maximum der Assimilationsgröße im Spektralbezirk zwischen den Frauenhofer'schen Linien *B* und *C* zusammen.

Der für die photodynamische Wirkung unerläßliche Sauerstoff steht auch der Pflanze in reichem Maße zur Verfügung, Ausschalten des gasförmigen Sauerstoffes bringt beide Prozesse zum Stillstand. Und endlich kann auf ältere Untersuchungen verwiesen werden, die eine Chlorophyllösung als einen hochgradig empfindlichen Sensibilisator für die roten Strahlen zur Sensibilisierung photographischer Platten geeignet fanden.

Die photodynamische Wirkung von Chlorophyllösungen auf Paramäcien und Blutkörperchen ist sehr kräftig und in ihrer Intensität natürlich nicht mit der Wirkung des nativen Chlorophylls im Chloroplasten zu vergleichen. Das Chlorophyll liegt einerseits hier nicht in einer so reaktionsfähigen Form vor, die Pflanze verfügt über eine Reihe von Schutzeinrichtungen, die eine zu starke Belichtung unter normalen Verhältnissen hintanhalten, und aus Hausmann's Untersuchungen geht deutlich die der Intensität nach so verschiedene Wirkung reiner Chlorophyllpräparate und methylalkoholischer Blattextrakte hervor.

Erstere sind noch in einer Verdünnung von 1 : 3,000.000 wirksam. Es scheint aber doch nicht ausgeschlossen, daß die Schädigung des Chloroplasten im intensiven Licht zum Teil einer photodynamischen Wirkung zuzuschreiben sei.

Alle angeführten Gründe werden an Bedeutung noch gewinnen, wenn auch in einem anderen Punkte eine Übereinstimmung zwischen der Wirkung und dem Verhalten des Chlorophylls im lebenden Blatt und einer Grundbedingung für das Erscheinen der photodynamischen Wirkung auffindbar ist. Es betrifft die Fluoreszenzfähigkeit der verwendeten Lösung im einen Falle und die Möglichkeit der Fluoreszenz des Chlorophylls in der Zelle andrerseits. Hausmann hat in seiner 1909 erschienenen Arbeit zwar betont — in Übereinstimmung mit Molisch, Hansen, Reinke etc. —, daß eine bisher nicht beobachtete Fluoreszenzfähigkeit lebender Blätter nicht als Gegenbeweis zu diesen Ausführungen gelten kann. Die wenigen Angaben, das lebende Chlorophyllkorn in einer der Farbe der Lösung des Chlorophylls gleichen Fluoreszenz zu zeigen, waren nicht allgemein anerkannt, wohl aber durch

Versuche von Molisch, Kohl, Hansen der Grund für das Nichteintreten einer leicht sichtbaren Fluoreszenz auch unter gewöhnlichen Verhältnissen aufgezeigt. Eine kräftig fluoreszierende Chlorophyllösung, mit Stärkepulver, Öl etc. geschüttelt, verliert augenblicklich ihre Fluoreszenz; diese kehrt aber wieder, sobald die als trübes Medium suspendierten Stärkekörner oder Öltropfen sich aus der Lösung abgeschieden haben.

Wenn bei Gegenwart eines trüben Mediums eine Lösung anscheinend nicht fluoresziert — und diese Verhältnisse sind im Chlorophyllkorn verwirklicht, wo wir nach Schimper das Chlorophyll gelöst in einer ölartigen Grundmasse und dann verteilt im farblosen Stroma annehmen —, so darf keinesfalls angenommen werden, daß eine Fluoreszenz überhaupt nicht vorhanden ist und damit auch keine photodynamische Wirkung. Es ist bereits in früheren Abschnitten angeführt worden, daß bei einer kräftigen Fluoreszenz der Lösung doch keine Wirkung des Systems Licht+fluoreszierender Körper vorhanden sein kann und umgekehrt Lösungen die Erscheinungen in aller Stärke zeigen können, wo nur bei Anwendung von konzentriertem, in einem scharf begrenzten Strahlenkegel gesammelten Licht oder bei Anwendung von Glaskapillaren (Molisch) die wirkliche Fluoreszenz zu zeigen ist.

Vor wenigen Jahren wurde es durch das von der Firma Reichert in den Handel gebrachte Fluoreszenzmikroskop ermöglicht, auch diese prinzipiell wichtige Voraussetzung von Hausmann's Arbeit — nämlich die Fähigkeit der Fluoreszenz des Chlorophylls im intakten Blatte — durch mikro- und makroskopische Beobachtung zu begründen und sicherzustellen. In diesem Mikroskop wird das an ultravioletten Strahlen reiche Licht einer Bogenlampe mit Eisenelektroden durch eine Linse aus reinstem Quarzglas gesammelt, die sichtbaren Strahlen durch ein Lehmann'sches Filter abfiltriert. Die passierten Lichtstrahlen von einer Wellenlänge $\lambda < 450$ werden durch einen Quarzglaskondensor von gleicher Form wie der Abbé-sche weiter konzentriert und treffen das auf Uviolglas befindliche Objekt, das auf dunklem Grunde durch die zugeführten Strahlen selbstleuchtend wird und in einer bestimmten Fluo-

reszenzfarbe sich scharf abhebt. Betrachtet man z. B. ein Moosblatt im Fluoreszenzmikroskop, so erscheint das im gewöhnlichen Lichte grüne Blatt in einer intensiv roten Fluoreszenzfarbe. Jedes einzelne Chlorophyllkorn hebt sich bei geeigneter starker Lichtquelle wie ein Blutstropfen von dunklem Grunde ab, wobei im mikroskopischen Bilde die Zellwand in deutlich blauer Fluoreszenzfarbe, die verschiedenen anderen Inhaltskörper der Zelle, Kryställchen, Stärke etc. in ganz charakteristischer Farbe erscheinen. Ein panaschiertes Blatt von *Aucuba japonica*, in den Strahlenkegel vor das Mikroskop gehalten, zeigt die grünen Blattpartien rot auf mattem Grunde, der den an Panaschüre erkrankten Stellen genau entspricht. Wird ein Moosblatt in Alkohol gelegt, um das Chlorophyll anzuziehen, so ist die rote Fluoreszenz im Chlorophyllstroma verschwunden, das jetzt nur mehr in sehr matter Farbe ebenso wie die übrigen Plasmateile sich zeigt; im Gegensatz zur alkoholischen Lösung, mit der man bei dieser Versuchsanordnung die Fluoreszenz noch in erstaunlicher Verdünnung nachweisen kann. Ich glaube, daß man im Fluoreszenzmikroskop das beste Hilfsmittel hat, die Frage der Chlorophyllbildung in ihrem zeitlichen Verlaufe genau zu studieren, denn bereits Spuren des Farbstoffes sind ganz lokalisiert in der Zelle auffindbar. Wie weit andere Stoffe, Begleitfarbstoffe des Chlorophylls oder Abbauprodukte des Farbstoffes mit dem Fluoreszenzmikroskop durch bestimmte Fluoreszenzfarbe leicht aufzufinden und zu identifizieren sind, muß erst weitere Untersuchung zeigen.

Wenn Hausmann in seiner Arbeit das physiologische und physikalische Verhalten des Chlorophylls allein nachdrücklichst betont, so mögen im folgenden in Ergänzung zu seinen Angaben Gründe angeführt werden, die nicht minder geeignet sind, die Richtigkeit der Annahme einer Rolle des Chlorophylls als Sensibilisator zu zeigen. Es betrifft den innigen Zusammenhang von Chlorophyll und plasmatischer Grundlage beim Assimilationsprozeß, für welchen ja das Stroma das Reaktionssubstrat gibt. Es gelingt durch äußere Einflüsse — und gerade auf diese Verhältnisse sollten weitere Untersuchungen ein besonderes Gewicht legen —, ohne Schädigung

des Chlorophylls eine Sistierung der Assimilation durchzuführen, wenn die lebende Grundmasse ohne tiefgreifende Schädigung alteriert wird. So gelang es Kny und Ewart zu zeigen, daß bei tiefer Temperatur, durch Gifte, durch leichte Narkose usw. eine CO_2-Assimilation unterbleibt. In den neuen Arbeiten von Irving (36), wo der Einfluß des Chloroforms auf die Atmung und die Assimilation studiert wird, tritt dies besonders deutlich hervor. Geringe Quantitäten von Chloroform bewirken in den dissimilatorischen Prozessen noch eine ausgesprochene Steigerung, wo der Assimilationsprozeß im Lichte bereits längst stillsteht.

Auf Grund der Arbeiten Palladin's, die zeigen, daß dissimilatorische Prozesse auf enzymatischen Reaktionsverlauf zurückzuführen sind, und den früheren Angaben Molisch's, daß isoliertes Chlorophyll in kritisch durchgeführten Versuchen niemals eine dem Assimilationsprozeß ähnliche Umsetzung erfährt, können diese Arbeiten als ein neuer Beweis für den »vitalen« Charakter der Assimilation angesehen werden. Das Stroma des Chlorophyllkornes ist dazu unerläßlich, isolierte Chlorophyllkörner oder solche, die im lebenden Gewebe vom farblosen Zytoplasma sich scharf abheben, können mit der Bakterienmethode als Assimilationsorte aufgezeigt werden. Und schließlich darf ich auch ein Ergebnis dieser Arbeit anführen, wo noch eine intensive photodynamische Wirkung auf die pflanzlichen Zellen und Gewebe sich in dem Ausbleiben einer Assimilation äußern kann, ohne daß eine grobe Strukturänderung sichtbar wäre.

Es blieb aber vorläufig die wichtige Frage offen: Was geschieht mit der durch Absorption im Chlorophyllkorn zurückgehaltenen Energie und wie wird diese verwendet?

Es ist bekannt, daß nur ein verhältnismäßig geringer Bruchteil im Dienste der CO_2-Assimilation verbraucht wird. Nach Timiriazeff beträgt die durch Absorption im Chlorophyll verbliebene Energie 27% der Sonnenenergie, aber im Maximum werden nur 3% für die photochemische Umsetzung verwendet. Brown und Ecombe (13), die in ihren mit größter Sorgfalt durchgeführten Versuchen die bekannte Erscheinung berücksichtigen, daß für den Assimilationsprozeß

in der freien Natur ebenso wie für das photometrische Verhalten assimilierender Organe (Wiesner, 11) das diffuse Tageslicht am wertvollsten ist, geben an, daß bei einer Absorptionsgröße von 95% nur 2·7% des Energiewertes in den durch endothermen Reaktionsverlauf entstandenen Produkten als potentielle Energie gespeichert sind. Wie die Bildung der Assimilationsprodukte erfolgt, welche chemischen Vorstufen sich bis zu einer Zuckersynthese auffinden oder wahrscheinlich machen lassen, kurz die rein chemische Seite der Assimilation, soll hier nicht weiter diskutiert werden (Grafe, 16).

Aber jedenfalls müssen auch bei diesem photochemischen Prozeß die Änderungen im Energiegehalt durch materielle Umsetzungen und die Energieformen, die dabei in Erscheinung treten, vom Beginn einer Reaktion ab studiert werden. Als ein ausgezeichnetes Mittel, den Eintritt und das Fortschreiten einer Reaktion zu bestimmen, hat sich in den meisten Fällen das Verhalten der elektrischen Leitfähigkeit erwiesen; denn jedem chemischen Gleichgewichtszustand kommt ein bestimmter Energiegehalt zu, entsprechend einer bestimmten elektromotorischen Kraft bei Anordnung des Systems in Form eines galvanischen Elementes.

Vollzieht sich die Reaktion im lebenden Organismus, so wird ihr Auftreten und ihr Verlauf durch Änderungen der pflanzlichen Elektrizität als eine Potentialdifferenz festzustellen sein. Experimentelle Untersuchungen darüber, wie sich das assimilierende Blatt dabei verhält, liegen leider nur wenige vor und diese stammen nicht immer von geschulten Pflanzenphysiologen, die die Natur ihrer Versuchsobjekte genau kennen.

Von Bedeutung scheinen die Angaben von Waller (13) zu sein, der die größte Änderung der Potentialdifferenz bei Verwendung der roten Strahlen konstatieren konnte, wobei der auftretende Strom im Momente der Belichtung von der belichteten zur unbelichteten Blatthälfte gerichtet war. Ohne ungleichmäßige Bestrahlung oder im Dunkeln blieb der Strom aus, ebenso bei leichter Narkose oder Abbrühen des Blattes. Leider sind diese Untersuchungen unter Vermeidung von Fehlerquellen — ungleiche Transpiration, ungleiche Erwärmung

bei Lichtzutritt etc. — nicht nachgeprüft und ich glaube, daß gerade solche Untersuchungen einen neuen Weg für das Studium der einzelnen Fragen der CO_2-Assimilation eröffnen.

Durch Zufuhr elektrischer Energie von außen her war eine zweite Möglichkeit gegeben, die Beziehungen zum Assimilationsprozeß kennen zu lernen. Pollacci (13), Thouvenin (13), Koltonski (13) berichten über eine ausgesprochene Förderung des Assimilationsprozesses bei Durchströmen von Versuchspflanzen im Lichte mit Gleich- oder Wechselstrom, bei Gleichstrom von einer stärkeren Wirkung. Ich glaube, daß nicht alle zurückgehaltene Energie zu einer Zustandsänderung des Plasmas oder einzelner Teile, z. B. der Plasmahaut — Thouvenin berichtet über eine größere Durchlässigkeit der durchströmten Zellen — verwendet wurde, es besteht die Möglichkeit eines tieferen Zusammenhanges der zugeführten elektrischen Energie und den photochemischen Umsetzungen in der Pflanze. Ich denke da vor allem an die auch für den Physiologen interessante Arbeit von Goldmann (Wiedemann's Annalen der Physik, Bd. 27 [1908], p. 450) über lichtelektrische Untersuchungen an Farbstoffzellen. Das Wesentlichste, das auf unser Problem Bezug hat, sei im folgendem wiedergegeben:

Besitzt ein in Form eines galvanischen Elementes angeordnetes, chemisches System lichtempfindliche Elektroden und ist die sich abspielende photochemische Reaktion reversibel, so wird die Änderung der elektromotorischen Kraft des Elementes bei Belichtung einer Elektrode und folgender Verdunklung besonders markant in Erscheinung treten. Nun gehört auch die Fluoreszenz zu den reversiblen Lichtreaktionen, denn nur bei Belichtung erfolgt die charakteristische Umwandlung in Strahlen geringerer Brechbarkeit, wobei im Momente der Belichtung das elektrische Leitvermögen geändert ist und damit die Möglichkeit gegeben ist, mit Hilfe fluoreszierender Farbstofflösungen photogalvanische Elemente herzustellen. Goldmann hat eine größere Zahl fluoreszierender Lösungen verwendet (Versuchsmethodik möge in der Originalabhandlung nachgesehen werden, da sie für den Physiologen weniger von Interesse ist) und gefunden:

»In allen Fällen ging der lichtelektrische Strom in der Lösung zur bestrahlten Elektrode; die spektralen Gebiete, die der Farbstoff am stärksten absorbiert, erzeugen auch die stärksten Ströme. Ein direkter Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und den lichtelektrischen Strömen in dem Sinne, daß ausschließlich fluoreszierende Farbstoffe geignet wären, besteht aber nicht, doch ist der Strom bei Belichtung fluoreszierender Lösung weitaus kräftiger.« Ferner »die Stärke des lichtelektrischen Stromes ist der Lichtstärke und der Belichtungsfläche proportional.«

Auf Grund molekulartheoretischer Anschauungen diskutiert der Autor die prinzipiell wichtigen Fragen, ob die Erregung eines lichtelektrischen Stromes »durch Elektronenauslösung« das Primäre sei und eine chemisch stoffliche Reaktion das Sekundäre, ob beide identisch oder ob das der ersten Annahme entgegengesetzte Verhalten zutreffe. Eine endgültige sichere Antwort ist nach Goldmann zurzeit nicht zu geben.

Längere Verwendung der Lösungen macht diese ungeeignet, da sie sich schon während des Versuches hydrolytisch spalten.

Die Analogien der Versuche von Goldmann mit den früher mitgeteilten Untersuchungen sind in Bezug auf Elektrizitätsproduktion der Pflanze und der Erscheinung der photodynamischen Wirkung gewiß sehr auffällig.

Unter Betonung der photodynamischen Wirkung bieten Goldmann's Untersuchungen noch eine weitere Ähnlichkeit: Hier wie dort ist nicht das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht von Bedeutung, sondern die absorbierte Energie. Eine Fortführung der Versuche und ein Übertragen auf die Probleme der Pflanzenphysiologie kann uns einen Einblick in den Mechanismus der CO_2-Assimilation geben, soweit der fundamentalste photochemische Prozeß der Natur als lichtbiologische Frage zu behandeln ist.

Wenn auch alle diese Ausführungen keine »Erklärung« geben, weil sie sich auf zwei Erscheinungen stützen, die selbst noch manches rätselhafte dem Physiker und Chemiker

bieten und uns auch heute noch ein einheitliches, scharf umrissenes Bild über eine Kinetik und Statik aller Phasen im Reaktionsverlauf der Kohlensäureassimilation fehlt, so dürften doch die Wege bezeichnet sein, die künftige Experimentaluntersuchungen einschlagen müssen. Mit einer einwandfreien Erklärung der Erscheinung der Sensibilisation und einer Erklärung der photodynamischen Wirkung, wie sie der Physiologe als Vorarbeit vom Physiker und Chemiker erwarten muß, ist gleichzeitig eine Aufhellung einer großen Zahl lichtbiologischer Prozesse geboten. Im leblosen Substrat sind die verschiedenen Zustandsänderungen — energetische und materielle — der lichtempfindlichen Systeme ungleich einfacher und leichter zu überblicken.

Und eine andere Tatsache sollten die Ausführungen dieses Abschnittes anschaulich dartun: In der Physiologie und auch in anderen Wissensgebieten ist mit der Auffindung einer bis dahin unbekannten Erscheinung oder in dem Darlegen eines bestimmten Gedankenganges oft ein neuer Standpunkt gegeben, von dem aus eine Anzahl anscheinend zusammenhangsloser Arbeiten überblickt werden kann und deren Ergebnisse von einem Gesichtspunkt aus verständlich werden.

Zusammenfassung.

1. Werden pflanzliche Zellen oder Gewebe in fluoreszierende Farbstofflösungen übertragen, so tritt eine photodynamische Schädigung ein: Im Licht erfolgt in den Versuchen weitaus früher eine Schädigung, beziehungsweise Tötung der Versuchsobjekte als im Dunkeln, in Kontrollversuchen mit reinem Wasser bleiben die Pflanzen oder Zellen sowohl im Dunkeln als auch im Lichte völlig intakt.

2. Wenn der zeitliche Verlauf der Schädigung auf pflanzliche und tierische Organismen vergleichsweise betont wird, so ist die größere Widerstandskraft pflanzlicher Zellen oder Gewebe auffallend. Es ist das Fehlen oder Vorhandensein einer Zellmembran dabei von Bedeutung; zartwandige, plasmareiche Zellen, wie es jene von *Symphoricarpus racemosus* sind, stehen an Empfindlichkeit den empfindlichsten tierischen Objekten (*Paramaecium*) nicht viel nach. Derbwandige Zellen

von *Elodea*-Blättern oder ganze Sprosse von *Ceratophyllum* sind sehr widerstandsfähig und erst nach zwei- bis dreitägiger Einwirkung bei relativ hoher Konzentration photodynamisch zu schädigen.

3. Die einzelnen Farbstoffe sind verschieden stark wirksam; kräftig wirksame Lösungen sind jene von Eosin, Magdalarot, Safranin und Rhodamin *B*; schwächer, aber deutlich wirksam sind Lösungen von Methylenblau, Neutralrot und Fluorescin. Cyanin ist intensiv giftig und bleicht stark ab bei Belichtung.

4. Die bestwirksamen Konzentrationen der einzelnen Farbstoffe liegen ziemlich hoch, durchschnittlich 1:1000 bis 1:800; sehr verdünnte Lösungen sind nur auf zarte Objekte (*Euglena*, *Symphoricarpus*, *Spirogyra*, Ligusterbeere — isolierte Zellen) wirksam, bei *Elodea*, *Nitella*, *Vallisneria* — ganze Blätter — und *Ceratophyllum* erfolgt bei verdünnten Lösungen nur Farbstoffspeicherung in der Membran.

5. Das Bild der Schädigung ist in allen Fällen ziemlich einheitlich. Es treten die von Klemm genauer studierten »Desorganisationsmerkmale« auf: reichliche Vakuolenbildung, Kontraktion des Plasmas unter starker Farbstoffspeicherung im vorher farblosen Plasma, ebenso deutliche Tinktion des Zellkernes.

6. Die Protoplasmaströmung wird durch die Einwirkung von Licht + fluoreszierender Farbstofflösung durch kurze Zeit der Einwirkung deutlich stimuliert; bei längerer Versuchsdauer erfolgt Stillstand der Strömung, ohne daß eine dauernde Schädigung stattfindet. Durch Übertragen in reines Wasser kann neuerdings Strömung auftreten. Später setzt ein vollständiges Sistieren der Strömung ein, worauf alsbald eine dauernde Schädigung erfolgt.

7. Werden vergleichsweise chlorophyllfreie und chlorophyllführende Zellen, Gewebe oder Organismen der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Farbstoffe ausgesetzt, so sind chlorophyllführende Objekte resistenter. Das konnte gezeigt werden bei Verwendung von

Hydra viridis und *H. fusca*,
Paramaecium bursaria und *P. caudatum*,
Stentor (zoochlorellenführend) und *St. coeruleus*

und endlich grüner und etiolierter Pflanzengewebe aus den Blättern von *Zea Mais* und *Phaseolus multiflorus.*

8. Bei längerer Versuchsdauer (1 bis 4 Wochen) treten in den Kulturgläsern im Detritus, den die photodynamisch geschädigten, abgestorbenen Pflanzen hinterlassen haben, reichlich Ciliaten, Amöben, Algenschwärmer und keimende Schwärmer auf, die in der Farbstofflösung sich entwickeln, ohne daß sie trotz der vorhandenen kräftigen Fluoreszenz der Lösung geschädigt würden. Die löslichen organischen Stoffe, besonders wasserlösliche Eiweißkörper, welche den zugrunde gegangenen Pflanzen entstammen, wirken hier hemmend oder können eine photodynamische Schädigung ganz ausschalten. Ähnliches zeigt die oligodynamische Wirkung von giftigen Cu- oder Zn-Salzen, wo nach Entfernung durch Adsorption der Giftstoffe an Baumwolle, Stärke, Ruß etc. die Wirkung ausgeschaltet werden kann. Es liegt im Falle der Hemmung oder Ausschaltung der photodynamischen Wirkung durch Zugabe von Eiweißkörpern wahrscheinlicherweise etwas Ähnliches vor.

9. Es ist die photodynamische Wirkung nicht nur Lichtwirkung, sondern gleichzeitig eine durch das Licht beschleunigte Giftwirkung; denn in Ergänzung zu den in Punkt 8 angeführten Tatsachen läßt sich zeigen, daß durch Zusatz von Giften in einer im Dunkeln unwirksamen Konzentration diese im Lichte in Kombination mit photodynamisch wirksamen Farbstoffen sehr wirksam sind. Das gilt für Äthylalkohol allein oder in Kombination mit wirksamen Lösungen und ebenso bei längerer Versuchsdauer auch für destilliertes Wasser allein, bei Verwendung geeigneter Versuchsobjekte (Paramäcien).

10. Die Fällung von zitronensaurem Eisenammon, die nach Molisch eine typische Lichtreaktion ist, läßt sich durch Zusatz fluoreszierender Stoffe nicht beschleunigen. Dagegen ist eine Fällung in dem an chemisch wirksamen Strahlen reichen Lichte der Quarzglas-Quecksilberdampflampe nach Heraeus bereits nach acht- bis zehnstündiger Bestrahlung zu erzielen, nach 20- bis 30stündiger Einwirkung ist die Fällung vollständig.

11. Bei Einwirkung von Eosinlösungen in passenden Konzentrationen und bei starker Belichtung unter Abhaltung der Wärmestrahlen ist es möglich, den Kern zu durchfärben. Auf Grund bisheriger Erfahrungen, die aussagen, daß nur der getötete Zellkern zu färben ist, muß es sich in den von mir beobachteten Fällen um eine Tötung des Zellkernes bei Lebenderhaltung des Plasmas handeln. Das zeigt auch die direkte Beobachtung solcher Präparate: bei Zellen von *Symphoricarpus racemosus* gelingt sehr leicht eine Plasmolyse, in Zellen von *Elodea*-Blättern oder von *Vallisneria spiralis* dauert die Plasmaströmung auch nach Durchfärbung des Zellkernes weiter. Zellen mit durchfärbtem Kern sind nur kurze Zeit, bis 24 Stunden lebensfähig.

12. Versuche mit Blättern phanerogamer Landpflanzen zeigen, daß bei starker Transpiration Säurefarbstoffe in die Parenchymzellen aufgenommen werden. Belichtete Blätter mit deutlich tingierter Blattnervatur sind photodynamisch zu schädigen und welken.

13. Die physikalischen und physiologischen Eigenschaften des Chlorophylls sowohl im lebenden Organismus als auch Lösungen außerhalb der Zelle weisen deutlich darauf hin, daß der Chlorophyllfarbstoff als optischer Sensibilisator in den Prozeß der CO_2-Assimilation eingreift. Dafür spricht die Analogie in bezug auf die Wirksamkeit in einem bestimmten Spektralbezirk bei photodynamischer Schädigung auf Paramäcien und dem gleichen Spektralbezirk beim Vorgang der CO_2-Assimilation. Ferner sind

1. Verteilung des Chlorophylls in der lebenden Pflanze,
2. Gegenwart von freiem Sauerstoff,
3. Vorhandensein eines plasmatischen Substrates

als Grundbedingungen erfüllt, um eine photodynamische Erscheinung in der lebenden Pflanze als sehr wahrscheinlich hinzustellen.

14. Mit Hilfe des Reichert'schen Fluoreszenzmikroskops gelingt der Nachweis der Fluoreszenz des Chlorophylls im intakten lebenden Blatt, wodurch die in Punkt 13 angeführten Tatsachen, auf welche sich die »Sensibilisationshypothese«

unter stetem Hinweis auf die photodynamische Erscheinung stützt, wesentlich an Bedeutung gewinnen.

15. Mit Rücksicht auf die Arbeiten von Goldmann u. a., welche den Nachweis erbringen, daß besonders fluoreszierende Farbstoffe sehr deutliche lichtelektrische Ströme liefern, wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß das Chlorophyll in der lebenden Pflanze in gleicher Weise wie in den Farbstoffzellen nach Goldmann als Energieüberträger wirksam sein könnte. Die Bedingungen, an welche eine derartige Wirksamkeit geknüpft ist, sind gleichfalls in der Pflanze realisiert: Inniger Kontakt mit dem Substrat, Zerfall und Neubildung des Farbstoffes bei Belichtung und nachweisbare Fluoreszenz. Das Auftreten von elektrischen Strömen, beziehungsweise Potentialdifferenzen an belichteten und nicht belichteten Stellen eines grünen Blattes spricht zugunsten dieser Deutung; ebenso stehen Versuche damit in Einklang, wo nach Pollacci ein Teil der Lichtenergie durch Zufuhr freier Elektrizität ersetzt werden kann.

Literaturnachweis.

Von Werken, die zusammenfassend Fragen über die photodynamische Erscheinung behandeln oder im allgemeinen damit verknüpfte physiologische Probleme oder Experimentaluntersuchungen diskutieren, seien angeführt:

1. Tappeiner H., v., Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Farbstoffe). Asher und Spiro, Ergebn. der Physiologie, VIII. Jahrg. (1909), p. 698 bis 741 (enthält vollständige Literaturzusammenfassung von Arbeiten bis 1909).
2. — und Jodlbauer A., Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Farbstoffe. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. F. C. W. Vogel, Leipzig 1907.
3. Jesionek, Lichtbiologie.
4. Eder J. M., Ausführliches Handbuch der Photographie. Halle a. S. 1892, 2. Aufl., I. Teil, I. Hälfte.
5. Benrath Alfr., Lehrbuch der Photochemie. Heidelberg 1912.

6. Neuberg C., Beziehungen des Lebens zum Licht. Berlin 1913.
7. Höber Rud., Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 3. Aufl., Leipzig 1913.
8. Pfeffer W., Pflanzenphysiologie, I. Bd., II. Aufl., Leipzig 1897.
9. Jost L., Vorlesungen über Pflanzenphysiologie, 3. Aufl., 1913.
10. Stahl E., Zur Biologie des Chlorophylls. Laubfarbe und Himmelslicht, Vergilbung und Etiolement. Jena 1909.
11. Wiesner J., v., Der Lichtgenuß der Pflanzen. Leipzig 1907.
12. — Die Entstehung des Chlorophylls in der Pflanze. Wien 1877.
13. Czapek, Biochemie der Pflanzen, I. Bd., II. Aufl., Jena 1913.
14. Grafe V., Einführung in die Biochemie. Wien 1913.
15. Przibram H., Experimentalzoologie. 4. Bd., Vitalität. Wien 1913.

Von Spezialarbeiten, die irgendeine der hier diskutierten Fragen eingehend behandeln oder in kleineren Sammelreferaten übersichtliche Zusammenstellung der Literatur bieten, seien nur zitiert:[1]

16. Grafe V., Die biochemische Seite der Kohlensäureassimilation durch die grüne Pflanze. Biochem. Zeitschr., Bd. 32 (1911), Heft 2, p. 114.
17. Czapek Fr., Chlorophyllfunktion und Kohlensäureassimilation (Sammelreferat). Berichte der Deutschen Botan. Gesellsch., 1902, Bd. XX, Generalversammlungsheft I.
18. Molisch H., Zur Lehre von der Kohlensäureassimilation im Chlorophyllkorn. Résultats scientifiques du Congrès international de Botanique, Wien 1906, p. 179.

[1] Vollständige Aufzählung einschlägiger Arbeiten, die, soweit sie mir zugänglich waren, studiert wurden, soll damit nicht geboten sein. Zur Orientierung, ebenso für das Nachschlagen genauer Literaturangaben verweise ich besonders auf Nr. 1, 2, 13, 16, 17, 18.

19. — Über die Fällung des Eisens durch das Licht und grüne Wasserpflanzen. Diese Sitzungsber., Bd. CXIX (1910).
20. — Über lokale Membranfärbung durch Manganverbindungen bei einigen Wasserpflanzen. Diese Sitzungsber., Bd. CXVIII (1909).
21. Hausmann W., Die photodynamische Wirkung des Chlorophylls und ihre Beziehung zur photosynthetischen Assimilation der Pflanzen. Pringsheim's Jahrb.
22. — Über optische Sensibilisatoren im Tier- und Pflanzenreiche. Aus Abderhalden, Fortschritte der naturwissenschaftl. Forschung, Bd. VI (1912), p. 243.
23. — Über die photodynamische Wirkung chlorophyllhaltiger Pflanzenauszüge. Berichte der Deutschen Botan. Gesellsch., Jahrg. 1908, Bd. XXVI*a*, Heft 7.
24. — und Kolmer W., Über die sensibilisierende Wirkung pflanzlicher und tierischer Farbstoffe auf Paramäcien. Biochem. Zeitschr., Bd. XV (1908), Heft 1, p. 12.
25. Kretzschmar P., Über Entstehung und Ausbreitung der Protoplasmaströmung infolge von Wundreiz. Jahrb. für wissenschaftl. Botanik, Bd. XXXIX, p. 273.
26. Josing E., Der Einfluß der Außenbedingungen auf die Abhängigkeit der Protoplasmaströmung vom Lichte. Jahrb. für wissenschaftl. Botanik. Bd. XXXVI, p. 197.
27. Eisler M., v. und Portheim L., v., Über die Beeinflussung der Giftwirkung des Chinins auf *Elodea canadensis* durch Salze. Biochem. Zeitschr., Bd. XXI (1909), Heft 1 und 2, p. 59.
28. Portheim L., v. und Hausmann W., Die photodynamische Wirkung der Auszüge etiolierter Pflanzenteile. Biochem. Zeitschr., Bd. XXI (1909), p. 51.
29. Klemm P., Desorganisationserscheinungen der Zelle. Jahrb. für wissenschaftl. Botanik, Bd. XXVIII, p. 627.
30. Hertel E., Über die Beeinflussung des Organismus durch Licht, speziell durch die chemisch wirksamen Strahlen. Zeitschr. für allgem. Physiologie, Bd. IV (1904).
31. — Über physiologische Wirkung von Strahlen verschiedener Wellenlänge. Ebenda, Bd. V (1905).

32. Fuchs R. F., E. Hertel's (Jena) Untersuchungen über die Wirkung von Lichtstrahlen auf lebende Zellen (Referat). Biolog. Zentralblatt, Bd. XXVII (1907), p. 510.
33. Goldmann Alex., Lichtelektrische Untersuchungen an Farbstoffzellen. Wiedemann's Annalen der Physik, IV. Folge (1908), Bd. XXVII, p. 449.
34. Heimstädt O., Das Fluoreszenzmikroskop. Zeitschr. für w. Mikroskopie, Bd. XXVIII (1911), p. 330.
35. Tswett, Über Reichert's Fluoreszenzmikroskop und einige damit angestellte Beobachtungen über Chlorophyll und Cyanophyll. Berichte der Deutschen Botan. Gesellsch., Bd. XXIX (1911), p. 744.
36. Irving A., The effect of chloroform upon respiration and assimilation. Anales of Botany, Vol. XXV (1911), p. 1077.
37. Küster E., Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. Jahrb. für wissenschaftl. Botanik, Bd. L (1911), p. 261.
38. Fischel A., Untersuchungen über Vitalfärbung. Merkel-Bonnet, Anatomische Hefte, Bd. XVI (1901), Heft 52 und 53 (1901).
39. Angelstein Udo, Untersuchungen über die Assimilation submerser Wasserpflanzen. Beitr. zur Biologie der Pflanze, 1910. Inauguraldissertation der Universität Halle a. S., 1910.
40. Hassak C., siehe Molisch 2.
41. Hadži J., Über das Nervensystem von *Hydra*. Arb. des Zoolog. Inst. der Universität Wien, Tom. XVII (1909), p. 225.
42. Szücs J. und Kisch B., Über die kombinierte Wirkung von fluoreszierenden Stoffen und Alkohol. Zeitschr. für Biologie, Bd. LVIII (1912), Heft 12.
43. Tschachotin Sergeï, Die mikroskopische Strahlenstichmethode. Biol. Centralbl., 1912, pag. 623.
44. Kluyver A. J., Beobachtungen über die Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf höhere Pflanzen. Diese Sitzungsber., Bd. CXX (1911).
45. Stahl E., Über bunte Laubblätter. Annales du jard. bot. de Buitenzorg, vol. XIII.

Figurenerklärung.[1]

Fig. 1. Versuch mit Blättern von *Tussilago farfara* vom 8. August 1912. Die Nervatur war durchgehends kräftig gefärbt. Nicht etikettierte Fläschchen (obere Reihe, erstes Fläschchen von rechts und untere Reihe, letztes Fläschchen rechts sind Kontrollversuche in reinem Wasser). Diese Blätter standen im Dunkeln.

Fig. 2. Blätter von *Tussilago farfara* bei gleicher Versuchsanstellung nach Färbung der Nervatur bei Belichtung. Blätter der Kontrollversuche wie oben vollständig intakt. Die übrigen photodynamisch geschädigt. Die Blätter im ersten Fläschchen von rechts unten und im dritten Fläschchen von rechts oben intakt, da sie mit nicht fluoreszierenden Lösungen durchfärbt sind: mit Anilinblau das untere Blatt und mit Säurefuchsin das obere.

---

[1] Für die Herstellung dieser Aufnahmen sage ich meinem Bruder Anton herzlichsten Dank.